Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

ADSORPTIONSCHROMATOGRAPHIE LIPOPHILER NATURSTOFFE AN AKTIVKOHLE:

Begleitpyrone im Kawa-Rhizom (Piper methysticum FORST.)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
LIESELOTTE KLAPROTH
aus Frankfurt/Main

1966

Aus dem Institut

für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Adsorptionschromatographie lipophiler Naturstoffe an Aktivkohle: Begleitpyrone im Kawa-Rhizom (Piper methysticum FORST.)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

LIESELOTTE KLAPROTH

aus Frankfurt /Main

1. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel
2. Referent: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1966
Tag der Promotion: 15. JULI 1966

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0055

Die vorgelegte Arbeit wurde von November 1962 bis Februar 1966 im Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter der Leitung seines Direktors, Herrn Prof. Dr. R. Hänsel, durchgeführt, dem ich auch an dieser Stelle für die Anregung, die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie für die fördernde Anteilnahme am Fortgang der Untersuchungen meinen aufrichtigen Dank aussprechen möchte. In besonderer Weise bin ich Herrn Prof. Dr. Hänsel auch dafür dankbar, daß er mir die Möglichkeit gab, die Arbeit neben meiner beruflichen Tätigkeit für die Farbwerke Hoechst AG. auszuführen.

Voraussetzung hierfür war ferner das mir gezeigte Entgegenkommen meiner Firma, für welches ich vor allem Herrn Direktor Dr. F. Klatt, Leiter der Abteilung Verkauf Arzneimittel der Farbwerke Hoechst AG. in Frankfurt/Main-Höchst, sowie Herrn Dr. A. Flamme, wissenschaftlicher Leiter des Arzneimittel-Kontors Berlin, zu Dank verpflichtet bin.

Unter den Assistenten, Kollegen und Mitarbeitern am Institut für Pharmakognosie, denen allen ich für ihr stets bereitwilliges Eingehen auf meine Bitten und Wünsche zu danken habe, gilt mein besonders herzlicher Dank Herrn Dr. H. Sauer für viele wertvolle Ratschläge und klärende Gespräche.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG 7
Zur Charakterisierung der untersuchten Pflanze 13

I. HAUPTTEIL

A) Übersicht über bisher beschriebene Methoden zur Isolierung der Kawalactone 16

1) Kristallisationsverfahren 16

2) Chromatographische Verfahren 19

B) Untersuchungen zu einem neuen adsorptions-chromatographischen Verfahren 20

1) Theoretische Grundlagen der Adsorptions-chromatographie 20

a) Die Adsorption 20
b) Die eluotrope Reihe der Lösungsmittel 22
c) Die quantitative Erfassung adsorptiver Vorgänge und ihre mathematische Formulierung 23

2) Eigene adsorptionsanalytische Untersuchungen zum Verhalten der lactonischen Kawa-Inhaltsstoffe und von einigen strukturanalogen Verbindungen an Aktivkohle 27

a) Ausgangssituation 27
b) Bestimmung der Adsorptionsisothermen 30
c) Berechnung der Adsorptionsisotherme für p-Methoxykawain 40
d) Bestimmung der eluotropen Reihe organischer Lösungsmittel an Aktivkohle 40
e) Untersuchungen zum adsorptiven Verhalten von Dihydrochalkonen und Flavanonen 41

AUSWERTUNG und DISKUSSION der ERGEBNISSE aus TEIL I 43

Seite

II. HAUPTTEIL

A) Einsatz von Aktivkohle als Adsorbens zu einer qualitativen Nachuntersuchung des lipophilen Kawaextraktes 50

1) Ausgangssituation aufgrund der Befunde aus Teil I 50

2) Voruntersuchungen zum analytischen Verhalten von drei vermuteten Inhaltsstoffen 51

3) Untersuchungsmaterial und -methode 53

4) Ergebnisse der säulenchromatographischen Analyse 56

a) Analytischer Nachweis von p-Methoxykawain und Tetrahydroyangonin 56

b) Isolierung und Identifizierung von p-Methoxykawain 58

c) Versuche zur Isolierung und Identifizierung von Tetrahydroyangonin 62

B) Säulenchromatographische Auftrennung des lipophilen Kawaextraktes an Kieselgel 64

1) Prüfung auf das natürliche Vorkommen von 5,6-Dehydromethysticin 64

2) Nachweis und Isolierung eines neuen Inhaltsstoffes 66

3) Identifizierung des neuen Stoffes als 11-Methoxy-Yangonin 68

AUSWERTUNG und DISKUSSION der ERGEBNISSE aus TEIL II .. 73

ZUSAMMENFASSUNG 87

Literaturverzeichnis 89

Lebenslauf 92

EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

Die chemisch-analytische Untersuchung pflanzlicher Objekte vermittelt einerseits Kenntnisse von der Zusammensetzung des Pflanzenkörpers aus chemisch definierten Verbindungen, zum anderen führt sie zur Aufklärung der strukturbedingten Eigenschaften (Wirkungsqualitäten) von biogenen Naturstoffen.

Ausgehend von der Grunderfahrung, daß die Pflanzenwelt eine Vielzahl technisch oder medizinisch nutzbarer Wirkungsprinzipien anbietet, waren die älteren phytochemischen Untersucher vorwiegend daran interessiert, die kausalen Träger solcher Wirkungen aus dem komplexen biologischen Material zu isolieren und zu identifizieren, um anhand der gewonnenen Ergebnisse nach allgemein gültigen Beziehungen zwischen der chemischen Konstitution einer Verbindung und ihrer spezifischen Wirksamkeit zu suchen. Diese, primär an auffälligen Wirkprinzipien orientierten Arbeiten lieferten u.a. die Grundlage zur Entwicklung von synthetischen Arzneistoffen und haben ihre Berechtigung auch heute noch keineswegs verloren.

Darüber hinaus hat die fortschreitende Verbesserung von Isolierungs- und Nachweisverfahren in den letzten dreißig Jahren entscheidend dazu beigetragen, daß die Ergebnisse der chemischen Pflanzenanalyse in zunehmendem Maße auch mit biologisch-botanischen Problemstellungen in Verbindung gebracht wurden.

Die Kenntnisse von der chemischen Mannigfaltigkeit der sogenannten "sekundären Pflanzenstoffe" und von ihrer unterschiedlichen Verbreitung im Pflanzenreich erschlossen der systematischen Botanik neue Wege zur Klärung taxonomischer Fragen. So wurde mit der Einführung eines chemotaxonomischen Ordnungsprinzips der Versuch unternommen, die Ausbildung bestimmter Substanzen im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel als Ausdruck einer phylogenetischen Verwandtschaft zwischen den betreffenden Taxa zu deuten.

Auf die besonderen Anforderungen, die dabei an ein taxonomisch brauchbares chemisches Merkmal zu stellen sind, soll hier nicht

im einzelnen eingegangen werden, zumal diese Fragen zur Zeit noch eingehend diskutiert werden. Neue Gesichtspunkte ergaben sich z.B. im Hinblick auf die taxonomische Bewertung von Verbindungsklassen, deren Vorkommen mit morphologisch-anatomischen Merkmalen korreliert ist. Sofern nämlich zwischen dem Vorhandensein bestimmter Stoffgruppen und der Ausbildung von strukturellen Organisationen in einem Pflanzenkollektiv ein funktional bedingter Zusammenhang besteht, darf dem chemischen Merkmal keine eigene taxonomische Aussagekraft beigemessen werden (Hänsel 1962; Schaaf 1964; Rimpler 1964).

Darüber hinaus muß die Fähigkeit zur Biosynthese bestimmter Substanzen des Sekundärstoffwechsels wohl grundsätzlich als ein relativ "anfälliges" Kriterium für eine Zusammengehörigkeit pflanzlicher Organismen angesehen werden. Im Vergleich zur Komplexität der biochemischen Abläufe im Baustoffwechsel, durch welche eine bestimmte Struktureigentümlichkeit geprägt wird, ist der Aufbau von einzelnen Stoffwechselendprodukten ein verhältnismäßig einfacher, aber offenbar auch verstärkt störungsempfindlicher Vorgang. Es darf daher nach den absoluten Grenzen gefragt werden, in denen der qualitativen und quantitativen Verteilung von "sekundären Pflanzenstoffen" überhaupt eine überindividuelle Stabilität zukommt. Sicher ist dieser Bereich zu eng begrenzt, um taxonomisch-phylogenetische Beziehungen zwischen größeren systematischen Einheiten an gemeinsamen chemischen Merkmalen erkennen zu lassen. Andererseits konnten jedoch mit Hilfe der chemischen Pflanzenanalyse häufig f e i n e r e Divergenzen innerhalb der einzelnen Taxa aufgezeigt werden, deren Abgrenzung mit anderen Methoden nicht möglich ist. Die Entdeckung von solchen "chemischen Rassen" als kleinsten Einheiten mit einem überindividuellen Gruppencharakter hat daher besonders der phylogenetischen Frage nach der Konstanz biologischer Arten neue Aspekte verliehen. In dieser Hinsicht dürfen von der phytochemischen Forschung sicher noch weitere wichtige Beiträge zu einem tieferen Verständnis von taxonomisch-phylogenetischen Zusammenhängen erwartet werden.

Ein zweites Aufgabengebiet für die chemische Pflanzenanalyse ergibt sich aus der Betrachtung der einzelnen sekundären Pflanzenstoffe unter physiologisch-biogenetischen Gesichtspunkten.

Dabei verbietet zwar die angewandte Methode eine experimentelle Aufklärung des eigentlichen Biogeneseweges dieser Substanzen, da der Ablauf einzelner Reaktionsschritte sich nur am lebenden Objekt erfassen läßt. Solche physiologisch-chemischen Arbeiten haben jedoch bereits zu Ergebnissen geführt, die den biosynthetischen Aufbau von Grundkörpern einiger Stoffgruppen - z.B. der Terpene, Lignane, Flavonoide oder Alkaloide - heute weitgehend erkennen lassen. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß letzten Endes eine relativ kleine Anzahl einfacher, ubiquitärer Metabolite des Primärstoffwechsels (Aminosäuren, Phenylpropankörper, Acetat-(Malonyl)-einheiten u.a.) als Bausteine am Aufbau all dieser Verbindungstypen beteiligt ist. Erst die unterschiedliche Zahl, Kombination und Art der gegenseitigen Verknüpfung dieser Bauelemente zu größeren Molekülen führt zu der tatsächlich beobachteten Vielfalt chemisch definierter Stoffgruppen im Pflanzenreich.

Die experimentell gesicherte Kenntnis von der Entstehung eines chemischen Körpers aus bestimmten Vorstufen ermöglicht es, die Herkunft einzelner Molekülteile im Gesamtkomplex auch dann noch genau zu bestimmen, wenn die Grundstruktur im Zuge der Endausgestaltung - etwa durch Einführung oder Abspaltung von Atomgruppen, Veränderung der Oxydationsstufe oder Ausbildung von neuen Bindungen infolge intramolekularer Zyklisierungsreaktionen - abgewandelt wurde.

Ferner sind die - für einige sekundäre Pflanzenstoffe erkannten - Grundprinzipien der Biosynthese übertragen worden auf den Entstehungsweg anderer Verbindungen, deren Molekülstruktur sich auf analoge Reaktionsabläufe zwischen bekannten Vorstufen zurückführen läßt. Solche, auf Analogieschlüssen beruhenden Biogenesevorstellungen werden untermauert, wenn es gelingt, bestimmte geforderte Zwischenprodukte der Synthese in der Pflanze nachzuweisen. Als indirekte Stütze für eine Biogenesetheorie darf aber auch der Umstand gewertet werden, daß die Hypothese das gleichzeitige Auftreten mehrerer Inhaltsstoffe (in einer Pflanze oder innerhalb eines Taxons) verständlich macht.

So ist es gelegentlich sinnvoll, unter den Sekundärstoffen einer Pflanze nach "theoretisch denkbaren" Derivaten einer bestimmten

Grundstruktur zu suchen, deren Nachweis Rückschlüsse auf allgemeine Variationsprinzipien bei der Endausgestaltung zuläßt und damit auch das Vorkommen des angenommenen Primärkörpers wahrscheinlich macht.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Sinne dieser Betrachtungsweise mit einer Gruppe lactonischer Inhaltsstoffe aus der Piperacee Piper methysticum FORST.
Für die Verbindungen vom Grundtyp des 6-Styryl-α-pyrons vermuteten bereits Birch u. Donovan (1953) eine den Flavonoiden analoge Entstehungsweise, bei der jedoch nach der Verknüpfung eines C_6-C_3-Bausteins mit z w e i (statt wie bei den Flavonoiden drei) C_2-Einheiten ein Ringschluß über das Sauerstoffatom der endständigen Carboxylgruppe unter Ausbildung der α-Pyronstruktur anzunehmen wäre. Die Hypothese wurde gestützt durch den Nachweis von zwei Chalkonkörpern, die mit den Kawalactonen vergesellschaftet im Rhizom der Pflanze auftreten und die die gleichen - unsubstituierten bzw. p-methoxylierten - Phenylpropanvorstufen enthalten, die auch bei den lactonischen Verbindungen angetroffen werden (Hänsel, Ranft u. Bähr 1963).

Ein Strukturvergleich der sechs, zu Beginn unserer Arbeit bekannten Kawalactone (Formel II bis VII) zeigt, daß bei der Endausgestaltung der 4-Methoxy-6-styryl-α-pyron-Grundstruktur (Formel I) zwei Variationsprinzipien verwirklicht wurden:

1) Der Eintritt von Substituenten in den Phenylring;
vertreten sind drei Typen:

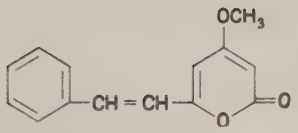
R_1 = R_2 = H (Desmethoxy-Yangonin- oder Kawain-Typ)

R_1 = OCH_3; R_2 = H (Yangonin-Typ),

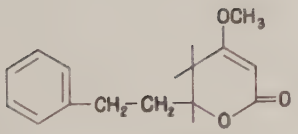
R_1 + R_2 = O-CH_2-O (Methysticin-Typ);

2) die partielle oder totale Absättigung der beiden Doppelbindungen $\Delta 5$ und $\Delta 7$;
vertreten sind wiederum drei Typen:

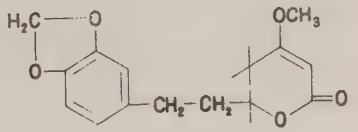
$\Delta 5$ + $\Delta 7$ = gesättigt (Dihydrokawain und Dihydromethysticin)
$\Delta 5$ = gesättigt (Kawain und Methysticin),
$\Delta 5$ + $\Delta 7$ = ungesättigt (Desmethoxy-Yangonin und Yangonin).



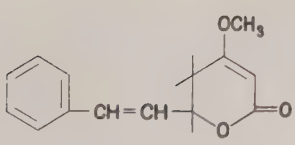
(I) 4-Methoxy-6-styryl-α-pyron
Grundstruktur der Kawalactone



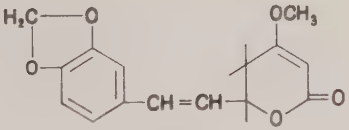
(II) Dihydrokawain



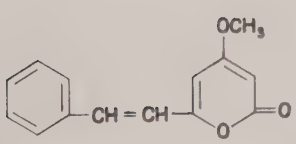
(III) Dihydromethysticin



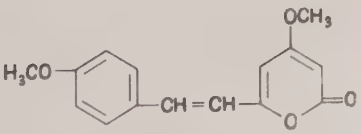
(IV) Kawain



(V) Methysticin



(VI) Desmethoxy-Yangonin
(= 5,6-Dehydrokawain)



(VII) Yangonin

Bei der systematischen Kombination der jeweiligen Typenmerkmale hinsichtlich des Substitutionsmusters und des Hydrierungsgrades lassen sich insgesamt neun Strukturvarianten formulieren, deren Ausbildung der Pflanze offenbar "grundsätzlich möglich" sein dürfte. Betrachtet man die Reihe der bisher nachgewiesenen Kawalactone unter diesem Gesichtspunkt, so findet man lediglich den unsubstituierten (Kawain-) Typ in allen d r e i Hydrierungsstufen vertreten, während der 4-methoxylierte (Yangonin-) Typ in z w e i und der 3,4-dioxymethylen-substituierte (Methysticin-) Typ in e i n e r Modifikation des Hydrierungsgrades fehlen.

Aus biogenetischen Gründen war für die Existenz dieser drei Verbindungen in der Kawadroge eine gewisse Wahrscheinlichkeit gegeben, wenngleich aufgrund des bisher fehlenden Nachweises anzunehmen war, daß ihr mengenmäßiger Anteil nur gering ist.

Auffallend erschien uns ferner die Tatsache, daß unter den bekannten Kawalactonen keine Strukturvarianten vom Typus eines Phenyl-äthyl-α-pyrons vertreten sind; Verbindungen also, bei denen die aliphatische Doppelbindung $\Delta 7$ hydriert, die ungesättigte Pyronstruktur dagegen erhalten ist.

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit sollte daher untersucht werden, ob mit Hilfe eines empfindlicheren neuen Analysenverfahrens auch Substanzen dieses Bautyps sowie Vertreter der oben beschriebenen, als "missing links" aufgefaßten Verbindungen in der Droge nachgewiesen werden können. Von den Ergebnissen einer derartigen gezielten Nachuntersuchung erwarteten wir Hinweise auf den zeitlichen Verlauf und den Mechanismus der Reaktionen, die zur Endausgestaltung der einzelnen Lactonkörper in der Pflanze führen.

Unser Versuch, die beschriebenen "potentiellen Inhaltsstoffe" des Kawarhizoms analytisch zu erfassen und nach Möglichkeit zu isolieren, ist eingegliedert in Untersuchungen zu einer - unseres Wissens bisher nicht beschriebenen - analytischen Methode: Dem Einsatz von Aktivkohle als Adsorbens zur säulenchromatographischen Trennung von lipophilen Substanzgemischen.

Wir gingen dabei von der Erfahrung aus, daß die lactonischen Kawastoffe bei der adsorptionschromatographischen Analyse des Methylenchloridextraktes an Aktivkohle nahezu selektiv durch Benzol eluiert werden können. Vorversuche hatten ferner gezeigt, daß mit diesem Verfahren auch innerhalb der Lactongruppe eine gewisse Auftrennung zwischen den einzelnen Verbindungen erzielt wird, wobei ihre Elutionsfolge erheblich feiner abgestuft ist als bei der Verwendung von Kieselgel oder Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel. Bei einer genaueren Kenntnis der spezifischen Haftfestigkeit der einzelnen Stoffe an Aktivkohle (einschließlich des Verhaltens bei den gesuchten Substanzen) sollte daher die methodische Voraussetzung gegeben sein, auch kleine Mengen der gesuchten Verbindungen in den entsprechenden, fraktioniert aufgegangenen Eluatanteilen zu erfassen.

Ziel unserer Arbeit ist somit weiterhin, die spezifische Bindungsfähigkeit der verschiedenen Lactonkörper an Aktivkohle in adsorptions-analytischen Modellversuchen zu bestimmen und anhand der Befunde einen gesetzmäßigen Zusammenhang zwischen der Konstitution und der Adsorptionsbereitschaft von organischen Substanzen aufzuklären.

Zur Charakterisierung der untersuchten Pflanze.

Der auf den pazifischen Inselgruppen Polynesiens und Melanesiens beheimatete strauchartige Rauschpfeffer, Piper methysticum FORST., (griech. μεθύσκομαι = sich berauschen) ist ein diözischer Vertreter der artenreichen Gattung Piper, von welchem ausschließlich männliche Exemplare bekannt sind und der sich daher nur auf vegetative Weise fortpflanzt.
Über den Habitus der Pflanze (Abb. 1) sowie über ihre Verwendung zur Bereitung des euphorisierenden, in höheren Dosen sedierenden Kawa-Trankes, eines bei den Einwohnern von altersher geschätzten Genußmittels, ist an anderer Stelle mehrfach berichtet worden (Beiersdorff 1959; Bähr 1962; Hänsel 1964).

Die Kawa bewirkt in kleinen Mengen genossen eine leichte Entspannung der quergestreiften Muskulatur, beseitigt Angstgefühle des Trinkers und führt zu innerer Heiterkeit und

Gelassenheit. Dieser sedativ-ataraktische Effekt macht verständlich, daß der Pflanze bereits früh großes Interesse entgegengebracht wurde. So berichtete Kapitän COOK (1728-1779) von der Sitte des Kawa-Trinkens auf Hawai, und die beiden FORSTER (Vater und Sohn), die COOK auf einer seiner Weltreisen begleiteten (1772-1775), gaben die erste botanische Beschreibung von Piper methysticum.

Zur Herstellung des Kawa-Getränkes benutzen die Polynesier vorwiegend das Rhizom der Pflanze mit den basalen Anteilen des oberirdischen Sprosses. Auch die auf dem europäischen Markt handelsübliche Droge stellt den Wurzelstock in geschältem und geschnittenem Zustand dar (Rhiz. Kava-Kava, Erg.B. 6). Andererseits ist bekannt, daß z.B. auf den Fidschi-Inseln und auf der Insel Samoa auch die oberirdischen Teile allein Verwendung finden, so daß die - bis heute nicht eindeutig identifizierten - pharmakodynamisch wirksamen Agentien auch in den verholzten Stengeln und in derem weichen Markanteil lokalisiert sein dürften. Stengel und Mark von Pflanzen unterschiedlicher geographischer Herkunft wurden daher im Verlauf unserer Untersuchungen einer vergleichenden Prüfung auf das Vorkommen der lactonischen Inhaltsstoffe unterzogen.

Abb. 1

H a b i t u s d e r K a w a - P f l a n z e .
(aus: R. Hänsel, "Piper methysticum, der Rauschpfeffer, Geschichte und gegenwärtiger Stand der Wirkstoff-Forschung" Dt.Ap.Zeitg. 104, 1964, 459 u. 496.

I. HAUPTTEIL

A) Übersicht über bisher beschriebene Methoden zur Isolierung der Kawalactone.

1) Kristallisationsverfahren.

Bei der Extraktion des gemahlenen Kawarhizoms mit lipophilen Lösungsmitteln (Chloroform, Methylenchlorid) erhält man eine klare, goldbraun gefärbte Lösung, die nach dem Vertreiben des Lösungsmittels einen dunkelbraun-grauen, schwach aromatisch riechenden, klebrigen Rückstand hinterläßt. Die Menge dieses Rohextraktes entspricht ca. 9,5 % der eingesetzten luftrockenen Droge.

Zur Auftrennung eines solchen komplex zusammengesetzten Pflanzenauszugs in Einzelstoffe kannten die älteren Phytochemiker vornehmlich zwei methodische Möglichkeiten: Einerseits die Elimination bestimmter Stoffgruppen durch chemische Reaktionen (z.B. Aufnahme von Gruppen mit basischen, sauren bzw. neutralen Eigenschaften), andererseits Trennmethoden, deren Effekt auf prinzipiellen oder graduellen Unterschieden im Lösungspotential der einzelnen Substanzen beruht (Ausschüttelungs- und Kristallisationsverfahren). Durch sinnvolle Wahl der Versuchsbedingungen gelangte man so vom Gesamtauszug zu Einzelfraktionen, die einen oder wenige der Hauptinhaltsstoffe soweit angereichert enthielten, daß sie bei weiterer Aufarbeitung in reiner Form gewonnen werden konnten.

Die Isolierung der lactonischen Kawastoffe aus dem Drogenextrakt bereitet aufgrund der gemeinsamen molekularen Grundstruktur dieser Substanzen und ihres weitgehend gleichartigen chemischen und physikalischen Verhaltens größere Schwierigkeiten. Lediglich zwei Vertreter der Gruppe unterscheiden sich von den übrigen durch eine deutlich geringere Löslichkeit in stärker polaren Solventien wie Äther oder Äthanol.

Nimmt man den eingedickten Extrakt in siedenden Äther auf, so scheidet sich beim Erkalten der Lösung ein kristallines Gemisch aus, das hauptsächlich aus den beiden zuerst beschriebenen Inhaltsstoffen Methysticin (M) (Cuzent 1860; Gobley 1860; O'Rorke 1860) und Yangonin (Y) (Nölting u. Kopp 1874) besteht. Sie lassen sich dank ihrer guten Kristallisationsneigung und ihres relativ reichlichen Vorkommens in der Droge leicht gewinnen und durch fraktionierte Kristallisation aus Methanol ohne Schwierigkeiten voneinander trennen.

Erheblich schwieriger ist es, aus dem in Lösung gebliebenen Stoffgemisch reine Verbindungen zu isolieren.
Winzheimer (1908) konnte ein aus dem äthanolischen Extrakt der Kawawurzel gewonnenes Kristallgemisch durch "systematisch geleitetes Kristallisieren aus Aceton" zerlegen in Methysticin, Yangonin sowie einen weiteren Stoff vom Schmelzpunkt 113-114°. Wegen ihrer Ähnlichkeit mit Methysticin nannte er die neugefundene Verbindung Pseudomethysticin. Winzheimer selbst verweist aber schon ausdrücklich auf die Schwierigkeit, den Stoff vollständig von Begleitkomponenten zu reinigen.

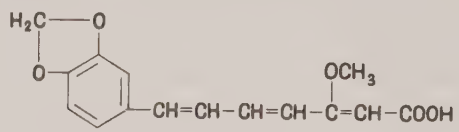
Borsche u. Peitzsch (1929 a) fanden bei der alkalischen "Verseifung" von Pseudomethysticin zwei verschiedene Säuren, nämlich außer der Methysticinsäure ($C_{15}H_{14}O_5$) die um eine Doppelbindung ärmere Dihydromethysticinsäure ($C_{15}H_{16}O_5$). Beide konnten in Form ihrer Methylester leicht voneinander getrennt werden. Damit erwies sich die von Winzheimer beschriebene Substanz als ein Mischkristallisat aus Methysticin und Dihydromethysticin, wobei das letztere zugleich als ein weiteres natürlich vorkommendes Kawalacton wahrscheinlich gemacht wurde. Erst viele Jahre später jedoch gelang es Hänsel u. Beiersdorff (1959), mit Hilfe säulenchromatographischer Methoden reines DHM aus der Droge zu isolieren.

Im Rahmen der intensiven und bedeutenden Forschungsarbeiten über die Kawapflanze von Borsche und Mitarb. (1914-1930) wurden nicht nur zwei weitere Inhaltsstoffe, das Kawain (K) und Dihydrokawain (DHK), entdeckt, sondern auch die chemische Konstitution der bis dahin bekannten insgesamt fünf Lactonkörper

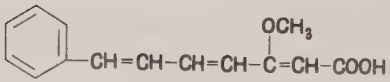
aufgeklärt [+]. Borsches Ergebnisse bestätigten, ergänzten und berichtigten in dieser Hinsicht die früheren Veröffentlichungen von Nölting u. Kopp über Yangonin, Winzheimer über Yangonin und Methysticin sowie Pomeranz (1889) über Methysticin.

Im Zusammenhang mit unserer Frage nach den Isolierungsmethoden für Kawalactone ist erwähnenswert, daß die Substanzen Kawain und Dihydrokawain ebenso wie Dihydromethysticin nicht primär als Inhaltsstoffe der Pflanze nachgewiesen, sondern ihr Vorkommen vielmehr aufgrund von Analogieschlüssen gefordert wurde (Borsche u. Peitzsch 1930), nachdem es gelungen war, eine dem Verseifungs- (genauer: dem Isomerisierungs-) produkt des Methysticins (= Methysticinsäure, Formel I) entsprechende, am Phenylrest unsubstituierte Säure (= Kawasäure, Formel II) im alkalisch aufgearbeiteten Kawaharz zu identifizieren (Borsche u. Roth 1921; Borsche u. Peitzsch (1929 b).

(I)



(II)



Der Versuch, das zweifach ungesättigte Lacton Kawain aus der Droge zu isolieren, stieß zunächst auf "erhebliche Schwierigkeiten" (Borsche u. Peitzsch 1930). Durch ein kombiniertes Aufarbeitungsverfahren, bei dem das mit schwachen Alkalien vorbehandelte Harz mit Petroläther-Hexan fraktioniert extrahiert und die Anteile einer fraktionierten Kristallisation aus Äther

[+] Die von Borsche formulierte Yangoninstruktur wurde durch spätere Arbeiten von Chmielewska u. Mitarb. (1954) sowie Bu'Lock u. Smith (1960) korrigiert und damit der endgültige Konstitutionsbeweis erbracht.

unterzogen wurden, gelang es Borsche, Kawain als einen natürlichen Inhaltsstoff des Harzes nachzuweisen.

Ebenso gezielt wurde aufgrund dieser Ergebnisse nach dem - dem DHM entsprechenden - zwischen den C-Atomen 7 und 8 gesättigten Strukturanalogen DHK als natürlichem Bestandteil der Kawawurzel gesucht. Bei weiterer Aufarbeitung der ätherischen Mutterlaugen (s.o.) erhielt Borsche schließlich ein Kristallgemisch aus K und einem weiteren Stoff, der durch manuelles Auslesen abgetrennt und als DHK identifiziert werden konnte.

2) Chromatographische Verfahren.

Für die pharmakologische Erforschung der Kawa mußten zunächst Isolierungsmethoden erarbeitet werden, die eine möglichst saubere Abtrennung reiner Substanzen in präparativem Maßstab erlaubten. Van Veen (1938) erkannte als erster die Eignung adsorptionschromatographischer Verfahren zur Lösung dieser Aufgabe. Als Adsorbens verwendete er einen getrockneten "Säure-Ton" (acid clay), von dem lediglich angegeben ist, daß es sich um ein in Java hergestelltes Produkt handelt. Zur Auftrennung eines Petrolätherextraktes aus den Stengelteilen der Pflanze wurde die Säule nach dem Entwickeln mit Petroläther-Äther-Gemisch (5-10-15 % Ätheranteil) in mehrere Teile zerschnitten, die getrennt mit Äthanol ausgezogen wurden. Aus Anteilen der Säulenmittelzone erhielt Van Veen eine Extraktfraktion, die sich durch ihre pharmakodynamische Aktivität (sedierender Effekt an Tauben und Affen) von allen anderen Fraktionen unterschied. Der enthaltene Wirkstoff konnte isoliert und durch wiederholtes Umkristallisieren aus Äther gereinigt werden. Er erwies sich später als identisch mit dem von Borsche nur unter großen Schwierigkeiten aus der Droge isolierten DHK.

Von Hänsel u. Beiersdorff (1959) wurde ein adsorptionschromatographisches Verfahren zur präparativen Gewinnung von DHM, K und DHK an Aluminiumoxyd beschrieben. Sie gaben den ätherischen Drogenauszug, aus dem sich M und Y bereits während der Extraktion freiwillig ausgeschieden hatten, über eine Säule mit neutralem Aluminiumoxyd (Merck, Aktivitätsstufe II-III) und eluierten mit wasserfreiem Äther. Im Gegensatz zu einem Hinweis

Van Veens fanden sie das Adsorbens gut geeignet zur Abtrennung von DHM aus dem Gemisch mit K und DHK. Während DHM - ebenso wie die verunreinigenden Begleitkomponenten des Auszugs - unter den angegebenen Bedingungen fest an der Säule haften blieb, enthielt das Eluat allerdings ein Gemisch aus K und DHK, das nur durch fraktionierte Kristallisation weiter getrennt werden konnte.

Das sechste und letzte der bei Beginn unserer Untersuchungen bekannten Kawalactone fanden Klohs u. Mitarb. (1959) ebenfalls bei der säulenchromatographischen Aufarbeitung eines Chloroformauszugs an Aluminiumoxyd. Sie identifizierten die neue Verbindung, die zusammen mit DHK und K in den ersten Eluatfraktionen anfiel, als Desmethoxy-Yangonin (DesY). Als Laufmittel diente in diesem Fall ein Gemisch aus "Skelly B" und Benzol im Verhältnis 1:1. DesY ist in Äther schwerer löslich als die beiden Begleitstoffe und konnte bei der fraktionierten Kristallisation aus den Mutterlaugen gewonnen werden.

B) Untersuchungen zu einem neuen adsorptionschromatographischen Verfahren zur Auftrennung des lipophilen Kawaextraktes an Aktivkohle.

1) Theoretische Grundlagen der Adsorptionschromatographie.

a) D i e A d s o r p t i o n .

Unter Adsorption versteht man üblicherweise die Erscheinung, daß gasförmige, flüssige oder gelöste Stoffe an der Oberfläche fester Körper angereichert werden. Dabei wird der die Oberfläche anbietende, und daher "bindende" Partner als Adsorbens bezeichnet, den am Adsorbens festgelegten, "gebundenen" Stoff nennt man Sorbend.

Da der Adsorptionsvorgang stets zu einem höheren Ordnungsniveau des Systems führen muß, kann er sich - dem 2. Energiesatz zufolge - nur dann freiwillig vollziehen, wenn die Bindung zwischen Adsorbens und Sorbend einen energetisch begünstigten Zustand darstellt. Das bedeutet anders ausgedrückt: Zwischen beiden Stoffen muß eine Kraft wirken, die ihre gegenseitige Bindung unter Freiwerden von Energie bedingt.

Nach der Art der wirkenden Bindungskräfte unterscheidet Griessbach (1957) zwischen einer p o l a r e n Adsorption, deren Ursache z.B. eine valenzchemische Reaktion zwischen den Partnern sein kann (Ionenaustausch, Chelatation oder Bildung von Pi-Komplexen) und der u n p o l a r e n , oder unspezifischen Adsorption, die keine molekularchemische Beziehung zwischen Adsorbens und Sorbend verlangt und dementsprechend auch nicht an stöchiometrische Relationen gebunden ist.

Griessbach postuliert als grundsätzliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Typen eine strenge Orts- (Punkt-, Flächen- oder Kanten-) orientierte Festlegung des Sorbenden bei der polaren Adsorption, (die z.B. durch Ladungsverschiebung, Dipolwirkung, aber auch Effekte aus einer geometrischen Strukturanalogie bedingt sein kann), während bei der unspezifischen adsorptiven Haftung keine Lokalisation für das zugrunde liegende Kausalprinzip möglich ist.

Ob das genannte Kriterium eine scharfe Unterscheidung zwischen zwei Adsorptionsarten zuläßt, kann im Rahmen der von uns angewandten Untersuchungsmethoden nicht beurteilt werden. Die Aktivkohle zählt nach Griessbach zu den unpolaren Adsorbentien, wie auch aus der Gegenüberstellung mit Polyamid als typischem Wasserstoffbrückenbildner klar hervorgeht - (sofern man von den in Handelsprodukten üblichen Beimischungen saurer Bestandteile in der Kohle absieht, die ja durch entsprechende Reinigungsprozesse eliminiert werden können, ohne daß das Material seine adsorptive Aktivität einbüßt).
Dennoch muß wohl angenommen werden, daß z.B. die spezifische Affinität von Aktivkohle zu aromatischen Systemen auf eine gerichtete Kraft - vergleichbar der von Griessbach bereits als polar verstandenen geometrischen Strukturanalogie - zurückzuführen ist.

Für das praktische adsorptionschromatographische Arbeiten kommt der exakten Unterscheidung keine wesentliche Bedeutung zu. Die adsorptionschromatographische Analytik nutzt lediglich das Faktum unterschiedlich starker Haftfähigkeit bei den Komponenten eines Stoffgemischs, um sie durch Ad- und Desorptionsvorgänge an den Grenzflächen einer festen Phase voneinander zu trennen.

Bei der Adsorption aus L ö s u n g e n ist dabei das Lösungsmittel als ein eigener Bestandteil des Stoffgemisches aufzufassen, der seinerseits mit den gelösten Substanzen in eine Rivalität um die freien Stellen am Adsorbens treten kann. In dieser Hinsicht besteht ein grundsätzlicher Unterschied zu den Verhältnissen bei der Gasadsorption.

Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Stoff B (wobei B auch das Lösungsmittel sein kann) eine Substanz A aus ihrer adsorptiven Bindung verdrängt, wird aber nicht allein durch den (stoffkonstanten) Grad seiner Affinität zum Adsorbens bestimmt, sondern wächst in der Regel auch mit steigender Konzentration von B (vgl. Abschnitt c). Dadurch wird es möglich, den Stoff A durch einen genügend großen Überschuß an Lösungsmittel (B) vom Adsorbens "abzuwaschen".

Das chromatographische Durchlaufverfahren (Säulenchromatographie) macht von dieser Möglichkeit Gebrauch: Nachdem ein Substanzgemisch durch das Entwickeln des Chromatogramms in einem mit Adsorbens gefüllten Glasrohr in verschiedene Zonen aufgetrennt ist, deren Lage (R_f-Werte) der unterschiedlichen Adsorptionsbereitschaft der Einzelkomponenten entspricht, werden die Stoffe durch das kontinuierlich nachlaufende Lösungsmittel in der Reihenfolge ihrer Wanderungsgeschwindigkeit vollständig aus der Säule ausgewaschen oder eluiert.

b) Die e l u o t r o p e R e i h e der Lösungsmittel.

Aus dem Vorhergesagten ergibt sich, daß die Elutionskraft eines Laufmittels dessen eigener Adsorptionsbereitschaft direkt proportional sein muß. Durch die Wahl des Laufmittels und ggf. den Übergang zu stärker eluierenden Lösungsmitteln kann somit die Trenngüte bei einem chromatographischen Prozeß entscheidend beeinflußt werden.

Aus diesem Grunde versuchten verschiedene Autoren, eine Anzahl häufig gebrauchter Lösungsmittel nach ihrer steigenden Elutionskraft an bestimmten Adsorbentien in eine "eluotrope Reihe" einzuordnen. Zur Bewertung der Elutionskraft ist dabei entweder die Adsorptivität des reinen Solvens direkt bestimmt worden,

(Jaques u. Mathieu, 1946), oder man ermittelte das stationäre Gleichgewicht zwischen Adsorbens und der Lösung bestimmter Substanzen (Trappe, 1940), und schließlich ist die Elutionspotenz aus empirisch gewonnenen Daten beim chromatographischen Arbeiten mit bestimmten Stoffgruppen beurteilt worden (Reichstein u. Shoppee, 1949; Neher, 1958).

Die von den verschiedenen Untersuchern angegebenen eluotropen Lösungsmittelreihen zeigen untereinander einige auffallende Abweichungen hinsichtlich der Einstufung von Laufmitteln. In diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung von Heřmánek, Schwarz u. Čekan (1963) erwähnenswert, in der versucht wird, die Ursache der Unstimmigkeiten aufzuklären. Heřmánek u. Mitarb. stellten bei der dünnschichtchromatographischen Prüfung einiger organischer Verbindungen an Aluminiumoxyd fest, daß die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Substanz und Lösungsmittel einen erheblichen Einfluß auf den R_f-Wert ausüben kann. So erwies sich z.B. Chloroform im Vergleich zu Äther unter sonst gleichen Bedingungen für einige Substanzen als stärkeres, für andere als schwächeres Elutionsmittel, und zwar in Abhängigkeit von der H-Acceptor- bzw. -Donator-Eigenschaft der jeweiligen Verbindung. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, daß die Elutionskraft eines Lösungsmittels notwendig die Resultante aus Wechselwirkungen zwischen Adsorbens, Substanz u n d Lösungsmittel sein muß, und daß sich deshalb eine allgemein gültige Lösungsmittelreihe überhaupt nicht aufstellen läßt.

Um den Einfluß des Laufmittels auf das Verhalten der Kawastoffe an Aktivkohle beurteilen zu können, waren wir auf eigene Untersuchungsbefunde angewiesen.

c) Die q u a n t i t a t i v e Erfassung adsorptiver Vorgänge und ihre mathematische Formulierung.

Ein Maß für die graduelle Adsorptionsbereitschaft eines Stoffes bietet die Substanzmenge, die im Adsorptionsgleichgewicht von einer Bezugseinheit Adsorbens festgehalten wird. Da es sich bei der Adsorption um einen grenzflächenaktiven Prozeß handelt,

bezieht man konsequenterweise auf die F l ä c h e n einheit des Adsorbens. Der Quotient wird dann als Oberflächenkonzentration bezeichnet und hat die Dimension C_o (g/cm^2).
Bei der experimentellen Bestimmung der Adsorptivität wird die Adsorbens m a s s e (Gewicht) als Bezugsgröße bevorzugt, weil sie sich leichter festlegen läßt; für ein und dasselbe Material ist sie der Oberfläche in jedem Falle proportional.

Die Oberflächenkonzentration im Adsorptionsgleichgewicht ist für ein gegebenes System abhängig von der Temperatur (T) sowie dem Druck (p), sofern der Sorbend gasförmig ist, bzw. der Lösungskonzentration (c), wenn ein gelöster Stoff adsorbiert wird:

$$C_o = f(T)_p \quad (\text{bzw. } c)$$

$$C_o = f(p \text{ oder } c)_T$$

Wird, wie es beim chromatographischen Arbeiten üblich ist, die Temperatur konstant gehalten, so läßt sich die quantitative Beziehung zwischen C_o und c durch Reihenversuche mit variierenden Lösungsmittelkonzentrationen bestimmen. Die graphische Darstellung dieser Funktionsabhängigkeit heißt Adsorptionsisotherme.

Von den verschiedenen möglichen Verlaufsformen der Adsorptionsisothermen sollen hier nur die beiden durch die Gleichungen von FREUNDLICH (I) und LANGMUIR (II) charakterisierten Beziehungen erwähnt werden, weil ihnen eine allgemeinere Gültigkeit zukommt.

(I) $x/m = k \cdot c^{1/n}$ Gleichung der Adsorpt.isothermen nach Freundlich;

(II) $x/m = K \frac{c}{c + a}$ Gleichung der Adsorpt.isothermen nach Langmuir.

x/m = adsorb. Substanzmenge pro Adsorbenseinheit ("Oberflächenkonzentration")
c = Lösungskonzentration
k u. K = Proportionalitätsfaktoren
1/n u. a = Adsorptionskonstanten.

Die zugehörigen Kurvenverlaufsformen zeigt Abb. 2

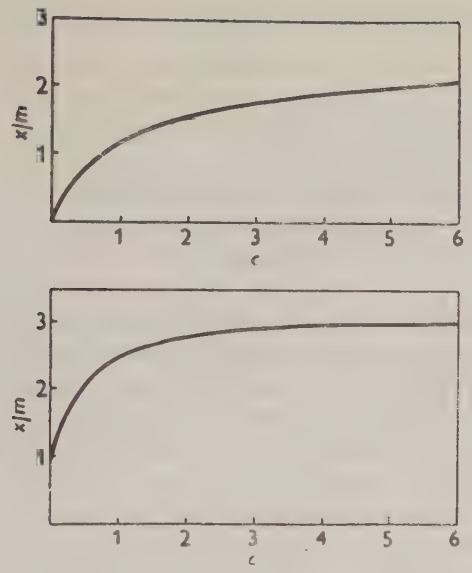


Abb. 2. Verlauf verschiedener Adsorptionsisothermen.
Obere Kurve: Beispiel für die Isotherme nach FREUNDLICH;
untere Kurve: Beispiel für die Isotherme nach LANGMUIR.
Aus Hais u. Macek: Handbuch der Papierchromatographie, Bd I, Jena 1958.

In der typischen, zur Konzentrationsachse (Abszisse) gekrümmten Form der Isothermen kommt zum Ausdruck, daß sich die differentielle Zunahme der pro Adsorbenseinheit festgehaltenen Substanzmenge mit wachsender Konzentration des Sorbenden vermindert. Aus der exponentiellen Beziehung zwischen Adsorption und Konzentration ergibt sich wiederum, daß bei der chromatographischen Analyse die höheren Substanzkonzentrationen eine Adsorbensschicht (Säule) rascher durchwandern als die niedrigeren und daß die Konzentrationsverteilung in der Säule daher nicht in ihrer ursprünglichen Form erhalten bleibt. Beim Aufbringen eines einzigen gelösten Stoffes bedingt vielmehr der Beladungsvorgang selbst bereits eine laufende Konzentrationsverminderung der Ausgangslösung in dem Maße, wie durch das Besetzen der ersten Adsorbensstellen Substanzteilchen aus ihr entnommen

werden. Da die nachfolgenden, weniger konzentrierten Anteile zunehmend stärker festgehalten werden, muß sich eine Chromatogrammzone mit scharfer Frontbegrenzung (entsprechend dem Konzentrationsmaximum), aber unscharfem, "geschwänzten" Endbereich ausbilden. Für die zugehörige Elutionskurve ergibt sich daraus die typische asymmetrische Verlaufsform: Nach steilem Anstieg und zunächst auch starkem Abfall zeigt sie mit zunehmendem Elutionsvolumen eine progressive Abflachung und schließlich asymptotische Annäherung an die Abszisse.

Es bleibt zu erwähnen, daß aus der gegenseitigen Lage der Adsorptionsisothermen im Koordinatensystem die relative G r ö ß e abgelesen werden kann, mit der sich verschiedene Substanzen in ihrer Adsorptionsbereitschaft unterscheiden. Allgemein ist die Bindungsfähigkeit eines Stoffes um so stärker ausgeprägt, je weiter seine Isotherme von der Abszisse entfernt liegt. Dementsprechend werden die Einzelkomponenten eines Stoffgemischs aus A, B und C bei einer säulenchromatographischen Auftrennung in der Reihenfolge wachsenden Abstandes ihrer Isothermen von der c-Achse eluiert.

Abb. 3 gibt schematisch die Verhältnisse wieder, die sich bei einer säulenchromatographischen Analyse des Substanzgemischs A, B, C aus der konvex gekrümmten Form der Adsorptionsisothermen ergeben.

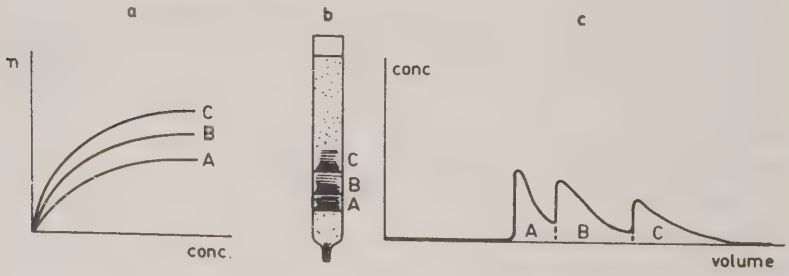


Abb. 3 Elutionsanalyse von 3 Substanzen mit konvexer Adsorptionsisotherme.
a) Adsorptionsisothermen
b) Auftrennung in der Säule
c) Elutionsdiagramm
Aus Heftmann: Chromatography, New York 1961.

2) Eigene adsorptionsanalytische Untersuchungen

a) A u s g a n g s s i t u a t i o n .

Bei einer Nacharbeitung des von Hänsel u. Beiersdorff angegebenen Verfahrens (s.S. 19) zeigte sich, daß die von uns angestrebte feinere Auftrennung der Kawalacton-Gruppe an Aluminiumoxyd nicht zu erreichen ist. Da wir besonders an einem Nachweis mengenmäßig wenig hervortretender Inhaltsstoffe interessiert waren, bedeutete eine mögliche irreversible Haftung von Substanzen an Al_2O_3 - wie sie z.B. für DHM gegeben ist - an sich schon eine Einschränkung der Erfassungsmöglichkeiten. Die methodische Unsicherheit wird noch erhöht dadurch, daß bereits bei geringfügiger Änderung des Wassergehaltes in der Säule (gleichbedeutend mit einer Veränderung der Aktivitätsstufe von Aluminiumoxyd) keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten werden.

Auf der Suche nach einem geeigneteren Adsorptionsmittel prüften wir die Verwendungsmöglichkeit von Aktivkohle, die infolge ihrer Graphitgitterstruktur eine ausgeprägte Affinität zu Aromaten besitzen soll (Lederer u. Lederer 1957).

Aktivkohle gehört zu den ältesten überhaupt bekannten Adsorptionsmitteln und ist in dieser Eigenschaft zu den verschiedenartigsten medizinischen und technischen Zwecken eingesetzt worden ("Darmentgiftung", Filtermaterial u.a.m.).
Als Adsorbens in der chromatographischen Analytik hat sie nur zögernd Aufnahme gefunden; aus naheliegenden Gründen werden hier farblose Materialien bevorzugt, die die Entwicklung des Chromatogramms mit dem Auge - ggf. unter UV-Licht - zu kontrollieren erlauben. Ältere Mitteilungen über die Verwendung von Aktivkohle zur Säulenchromatographie im Labormaßstab betreffen u. W. vorwiegend die Aufarbeitung von hydrophilen Stoffgruppen wie Zuckern und Aminosäuren (Tiselius 1947; Tiselius, Drake u. Hagdahl 1947) sowie die Trennung von Fettsäuren (Cassidy 1940; Cassidy u. Wood 1941; Cason u. Gillies 1955). Mit lipophilen Laufmitteln, d.h. an bewußt "desaktivierter Aktivkohle" zu arbeiten, bedeutet jedoch, wie wir zeigen möchten, eine wesentliche Erweiterung der Einsatzmöglichkeiten für dieses Adsorbens.

Orientierende Vorversuche hatten ergeben, daß der Methylenchloridextrakt aus dem Kawarhizom durch Säulenchromatographie an Aktivkohle mit Benzol als Elutionsmittel grob unterteilt werden kann in:

1) einen hochlipophilen Anteil (Stoffe unbekannter Struktur, ätherisches Öl?);
2) eine Gruppe von neutralen lipophilen Pflanzenstoffen gemischt aromatisch-aliphatischen Charakters, deren Molekül e i n e n Benzolkern enthält (Lactonfraktion);
3) Substanzen mit stärker ausgeprägten aromatischen Eigenschaften (z.B. Chalkone und Lactone mit einem durchkonjugierten Doppelbindungssystem, d.h. zugleich mit pseudoaromatischem Pyronring).

Unsere spezielle Aufgabe bestand darin, die Vertreter der Gruppe 2, mit vergleichsweise geringen strukturellen Unterschieden, durch eine möglichst abgestufte Elutionsfolge voneinander zu trennen. Auch in dieser Hinsicht erwies sich die Adsorption an Aktivkohle anhand der zunächst empirisch gefundenen Ergebnisse als besonders gut geeignet. Tab. 1 zeigt das Elutionsdiagramm einer säulenchromatographischen Analyse des Kawaextraktes an Aktivkohle bei Verwendung von Benzol und Methylenchlorid als Elutionsmittel.

Um allgemein gültige Angaben machen zu können über den Anwendungsbereich, in dem Aktivkohle anderen gebräuchlichen Adsorbentien überlegen ist, war es notwendig, die Gesetzmäßigkeiten im Adsorptionsverhalten von Kohle kennenzulernen: Durch adsorptionsanalytische Untersuchungen wollten wir feststellen, ob eine regelmäßige Beziehung zwischen der chemischen Struktur einer Verbindung und ihrer Adsorptionsbereitschaft an Kohle besteht und welcher Art dieser Zusammenhang ist. Weiterhin sollte geprüft werden, welchen Einfluß das Elutionsmittel auf die Adsorptionsvorgänge ausübt, d.h. die eluotrope Reihe organischer Lösungsmittel an Kohle war zu bestimmen. Zur Klärung dieser Fragen konnten die natürlich vorkommenden Kawalactone und einige synthetisch zugängliche Varianten des gleichen Bauprinzips dank der Regelmäßigkeit ihrer Strukturmodifikation gut als Modellsubstanzen herangezogen werden.

Elutions-mittel	Frakt. Nr.	Vol. (ml)	Rohrückstd. (g)	DC-nachgewiesene Substanzen
Benzol	0	500	-	-
	I	60	0,35	DHK
	II	2150	4,4	DHK, K, (THY)
Methylen-chlorid	III	1200	3,1	DHK, K, (THY), DHM
	IV	1000	0,9	(K),(THY), DHM, MK, (M)
	V	1600	9,4	(DHM),MK, M
	VI	6000	2,0	MK, M
	VII	6600	2,1	(MK),(M), DesY
Gesamt:		19110 =====	22,25 =====	
Gesamtrückgewinn: 22,25 g = 74 % des eingesetzten Extraktes.				

Tab. 1

Säulenchromatographische Analyse von 30,0 g Methylenchloridextrakt aus Kawarhizom an Aktivkohle.

(Säulendurchmesser = 5,5 cm; 200 g Adsorbens; Tropfgeschw. = 0,8 ml/min).

b) Bestimmung der Adsorptionsisothermen.

Die Tendenz zu einer unterschiedlichen und substanzspezifischen Haftfähigkeit an Aktivkohle hatte sich für die natürlichen Kawalactone bereits in den Ergebnissen der säulenchromatographischen Extraktaufarbeitung zu erkennen gegeben. Um feinere Abstufungen im adsorptiven Verhalten von Aktivkohle und ihre Abhängigkeit von der Molekülstruktur des Sorbenden erfassen zu können, bestimmten wir die Adsorptionsisothermen für die nachfolgend aufgeführten Modellsubstanzen im System Kohle - Methylenchlorid.

Übersicht und Charakterisierung der zur Aufnahme der Adsorptionsisothermen verwendeten Substanzen.

1.) 7,8-Dihydrokawain (DHK) = 4-Methoxy-6-phenyläthyl-5,6-dihydro-α-pyron. Natürl. (+)-Derivat vom Schmp. 59-60° *), aus der Droge isoliert.

2.) Kawain (K) = 4-Methoxy-6-styryl-5,6-dihydro-α-pyron. Natürl. (+)-Derivat vom Schmp. 108-110°, aus der Droge isoliert.

3.) 5,6-Dehydro-7,8-dihydrokawain (DeDiK) = 4-Methoxy-6-phenyläthyl-α-pyron. Synthetisiert nach Bu'Lock u. Smith (1960), Razemat vom Schmp. 97-98°.

4.) 5,6-Dehydrokawain (DeHK) = Desmethoxy-yangonin (DesY) = 4-Methoxy-6-styryl-α-pyron. Synthet. nach Bu'Lock u. Smith (s.o.), Schmp. 139-141°.

5.) Tetrahydroyangonin (THY) = 4-Methoxy-6-(4-methoxy-phenyläthyl)-5,6-dihydro-α-pyron. Zwei Herkünfte: (a) synthet. nach Bu'Lock u. Smith (s.o.), (b) synthet. nach Kostermans (1950); beide Präparate vom Schmp. 98-100°.

---

*) Sämtliche Schmelztemperaturen wurden auf dem Heiztisch-mikroskop nach Kofler bestimmt.

6.)**) 5,6-Dihydroyangonin = p-Methoxykawain (MK) = 4-Methoxy-6-(4-methoxystyryl)-5,6-dihydro-α-pyron. Synthet. nach Kostermans (s.o.), Razemat vom Schmp. 123°.

7.) 7,8-Dihydroyangonin (DHY) = 4-Methoxy-6-(4-methoxyphenyläthyl)-α-pyron. Partialsynthetisch nach Werny u. Hänsel (1963), Razemat vom Schmp. 102-106°.

8.) Yangonin (Y) = 4-Methoxy-6-(4-methoxystyryl)-α-pyron. Aus der Droge isoliert, Schmp. 155-157°.

9.) 7,8-Dihydromethysticin (DHM) = 4-Methoxy-6-(3,4-methylendioxyphenyläthyl)-5,6-dihydro-α-pyron. Natürl. (+)-Derivat vom Schmp. 118°, aus der Droge isoliert.

10.) Methysticin (M) = 4-Methoxy-6-(3,4-methylendioxystyryl)-5,6-dihydro-α-pyron. Natürl. (+)-Derivat vom Schmp. 135°, aus der Droge isoliert.

11.) 5,6-Dehydro-7,8-dihydromethysticin (DeDiM) = 4-Methoxy-6-(3,4-methylendioxyphenyläthyl)-α-pyron. Synthetisiert nach Bu'Lock u. Smith (s.o.), Razemat vom Schmp. 158-160°.

12.) 5,6-Dehydromethysticin (DeHM) = 4-Methoxy-6-(3,4-methylendioxystyryl)-α-pyron. Synthet. nach Bu'Lock und Smith, Schmp. 236°.

Versuchsanordnung: Für alle Untersuchungen wurde die Kohlesorte Brilonit N spezial der Firma Degussa, Frankfurt/Main, verwendet. Nach den Angaben des Herstellers handelt es sich bei diesem Produkt um eine "Entfärbungskohle", die nach dem Verfahren der Wasserdampfaktivierung aus Holzkohle gewonnen wird. Die Korngröße ist mit maximal 150 μ angegeben; nach Adsorptionsmessungen sollen die für die Adsorption infrage kommenden Porenweiten zwischen 0,5 und 50 mμ liegen. Die 1,0 g Brilonit N spezial entsprechende Oberfläche beträgt 700 bis 900 m^2.

**) vgl. hierzu den folgenden Abschnitt c.

Die als Maßeinheit für die Adsorptivität benutzte Größe x/m bezeichnet die Substanzmenge, die im Adsorptionsgleichgewicht von einer Gewichtseinheit Kohle gebunden wird in mmol/g.

Wir gaben jeweils 20 ml einer Methylenchloridlösung von bekanntem Gehalt an Reinsubstanz zu 2,00 g Kohle in ein Schliffkölbchen und durchmischten 30 Minuten auf der Schüttelapparatur. Nach 5 Min. Absetzenlassen wurde von der mit dem Sorbenden beladenen Kohle abfiltriert und 10,0 ml des Filtrats in ein dünnwandiges Erlenmeyerkölbchen pipettiert. Den Substanzgehalt in diesem Lösungsvolumen bestimmten wir gravimetrisch nach dem Vertreiben des Solvens im Eindampfgerät nach HECKER und KARLSON. Die Berechnung des gesuchten Quotienten x/m erfolgte nach der Formel:

$$x/m = \frac{S - R \cdot f}{A \cdot M}$$

Dabei bedeuten: x = adsorbierte Substanz (mg); m = Adsorbens (g); S = angebotene Substanz (mg); f = Umrechnungsfaktor darstellend den Quotienten aus angebotener Lösung (ml) und aufgearbeitetem Filtrat (ml); R = rückgewogene Substanz (mg); A = angebotene Aktivkohle (g); M = Molekulargewicht.

Sämtliche Versuche wurden bei Zimmertemperatur (ca. 20°) durchgeführt; eine auftretende Wärmetönung bei Zugabe der Lösung zum Adsorbens blieb unberücksichtigt.

Zu Kontrollzwecken variierten wir sowohl die Mengen angebotenen Adsorbens als auch das Lösungsvolumen und erhielten bei Wahrung des relativen Verhältnisses der beiden Variablen übereinstimmende Werte für x/m. Bei Einhaltung konstanter Relationen zwischen Kohlemenge, Lösungsvolumen und Volumen des untersuchten Filtrats sind die Ergebnisse gut reproduzierbar.

Geprüft wurde, soweit möglich, der Konzentrationsbereich von 100 bis 1 000 mg% (= ca. $2 \cdot 10^{-3}$ bis $4 \cdot 10^{-2}$ molar). Für Lösungen mit mehr als 1 % Substanzgehalt - bei einigen Stoffen bereits unterhalb dieser Grenze - verhindert die Kristallisationsneigung beim Filtriervorgang eine exakte Auswertung.

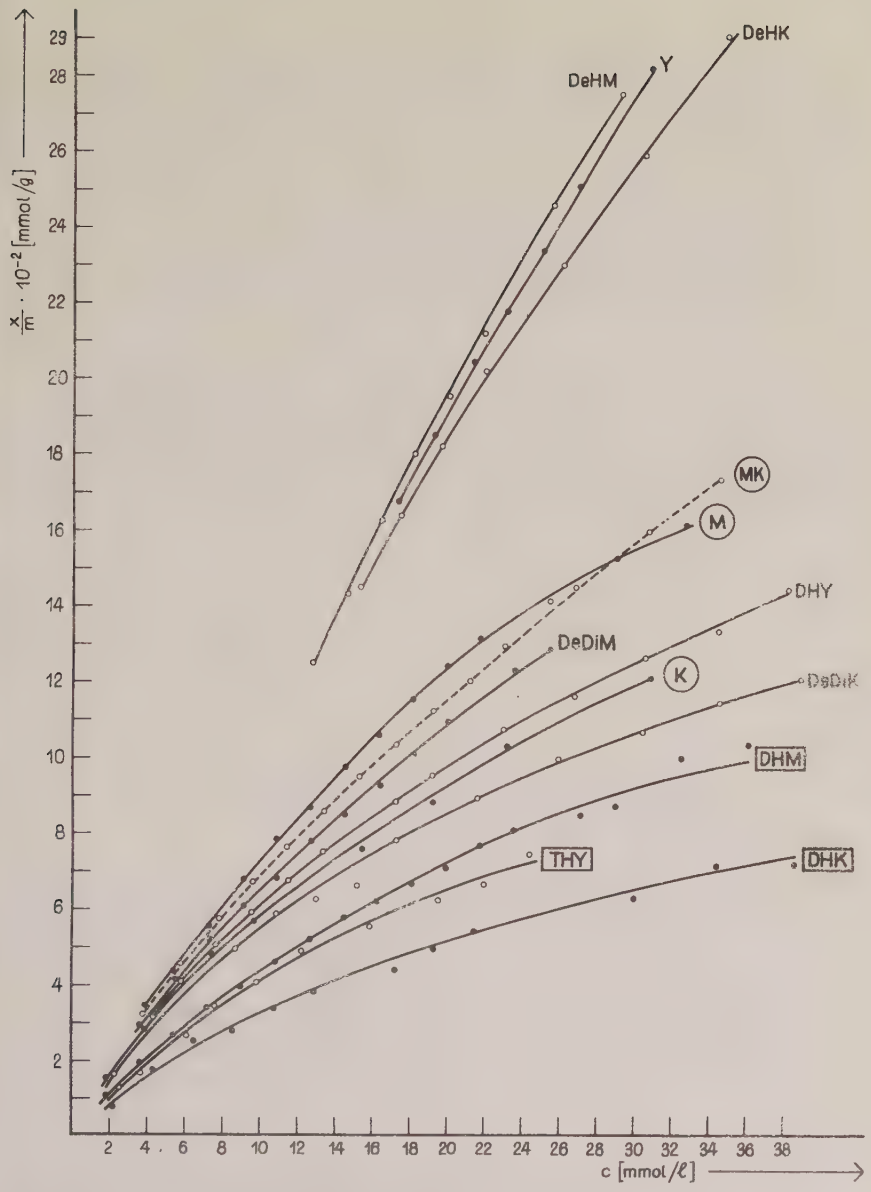


Abb. 4 Adsorptionsisothermen für Kawalactone und strukturanaloge Verbindungen (Aktivkohle-Methylenchlorid).

(gestrichelte Kurve für MK nach errechneten Werten entsprechend der Isothermenfunktion von FREUNDLICH).

Die Adsorptionsisothermen aller untersuchten Stoffe zeigen im geprüften Konzentrationsbereich einen leicht gegen die Abszisse geneigten Verlauf, wobei die für eine Adsorptionsfunktion zu erwartende s t a r k e Konvexkrümmung offenbar erst im Bereich höherer Konzentrationen liegt als aus methodischen Gründen in die Untersuchung einbezogen werden konnten. Es war daher noch zu prüfen, ob für das Verhalten der Substanzen an Aktivkohle unter den angegebenen Bedingungen tatsächlich die Gesetze der reinen Adsorption gültig sind.

Einen Hinweis hierfür lieferte bereits die Beobachtung, daß das Verhalten von zwei einander isomeren Vertretern der Strukturtypen A und B (Abb. 5) an Aktivkohle sich auffällig unterscheidet vom Verhalten dieser Verbindungen bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel oder Polyacrylnitril.

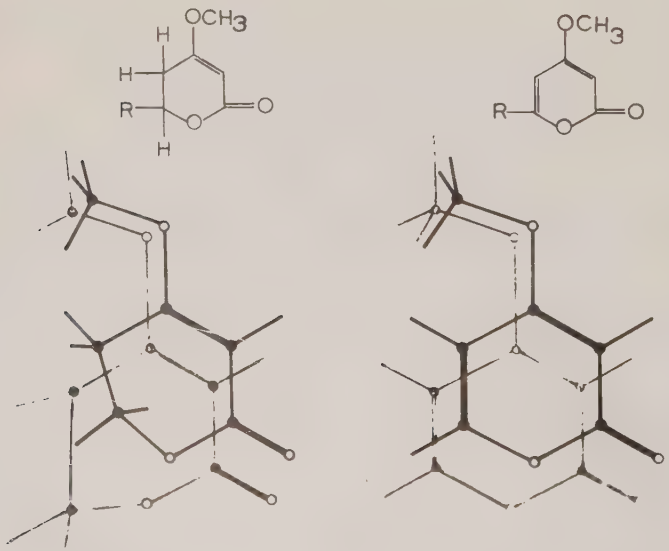


Abb. 5 Räumliche Darstellung vom Molekülbau der Strukturtypen A (R = Styryl-) und B (R = Phenyläthyl-).

Die Eigenschaften von Verbindungen des Typs B werden entscheidend bestimmt durch den pseudoaromatischen Charakter des Pyronrings, der beim Typ A fehlt. Während nun das Vorliegen eines ebenen Heterocyclus bei der Chromatographie an Kieselgel oder Polyacrylnitril (das gleiche gilt für Kieselgur) gegenüber der gewinkelten Ringstruktur zu einer bedeutenden Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit führt (Tab. 2), erweist sich die Haftfähigkeit der beiden Lactongruppen A und B an Aktivkohle als praktisch gleich groß, wie der Abb. 4 zu entnehmen ist.

Substanz	Lactonringstruktur		Kieselgel (I)	Polyacrylnitril (II)
	eben (B)	gewinkelt (A)	R_f	R_f
Kawain		+	0,34	0,47
DeDiK	+		0,46	0,72
p-OCH_3-K		+	0,29	0,32
7,8-DHY	+		0,39	0,62
Methyst.		+	0,30	0,26
DeDiM	+		0,40	---

Tab. 2
Vergleich der Rf-Werte isomerer Verbindungen der Strukturtypen A und B bei der DC an Kieselgel G (I) und an Polyacrylnitril (II). Mittelwerte aus je 3 Bestimmungen.
Laufmittel = Cyclohexan:Essigester, 1:1 (I) bzw. 8,5:1,5 (II), v.v.

Korrespondierende, d.h. bezüglich der Substitution am Phenylrest übereinstimmende Verbindungen des Typs A und B lassen sich somit an Aktivkohle n i c h t , an Kieselgel oder Polyacrylnitril dagegen befriedigend trennen.

Um den adsorptionsspezifischen Charakter der Isothermenfunktion zu beweisen, prüften wir an zwei Beispielen, ob die gefundene Beziehung x/m zu c den mathematischen Formulierungen nach FREUNDLICH und/oder LANGMUIR gehorchen.

Die FREUNDLICHsche Gleichung:

$$x/m = k \cdot c^{1/n}$$

verlangt in der logarithmierten Form eine lineare Beziehung zwischen log x/m und log c:

$$\log x/m = \log k + 1/n \cdot \log c.$$

Wie die Abb. 6 zeigt, wird diese Forderung für die Substanzen M und DHM in guter Annäherung erfüllt.

Nach rechnerischer Ermittlung der Werte für die Konstanten k und 1/n bestimmten wir ferner die theoretischen x/m-Werte für die beiden genannten Verbindungen nach der FREUNDLICHschen Gleichung. Tab. 3 gibt eine Gegenüberstellung der berechneten mit den experimentell gefundenen Adsorptionswerten.

	METHYSTICIN $k = 1{,}039 \cdot 10^{-2}$ $1/n = 0{,}845$		DIHYDROMETHYSTICIN $k = 7{,}579 \cdot 10^{-3}$ $1/n = 0{,}752$	
c (mg%)	$x/m \cdot 10^{-2}$ (mmol/g) gemess.	berechn.	$x/m \cdot 10^{-2}$ (mmol/g) gemess.	berechn.
100	3,09	3,08	1,99	1,99
150	4,36	4,34	2,67	2,70
200	5,56	5,55	3,36	3,34
250	6,77	6,68	3,80	3,98
300	7,82	7,78	4,58	4,55
350	8,66	8,87	5,20	5,12
400	9,71	9,98	5,79	5,67
450	10,50	11,01	6,18	6,16
500	11,50	12,02	6,65	6,68
550	12,40	13,03	7,06	7,15
600	13,12	13,93	7,75	7,70
650	---	---	8,12	8,16
700	13,92	16,00	---	---
750	---	---	8,34	9,09
800	15,18	17,9	8,66	9,35
900	16,21	19,7	9,00	10,42
1000	---	---	10,32	11,24

Tab. 3

Gegenüberstellung der gemessenen x/m-Werte mit den nach der Adsorptionsgleichung nach FREUNDLICH berechneten für die Substanzen M und DHM.

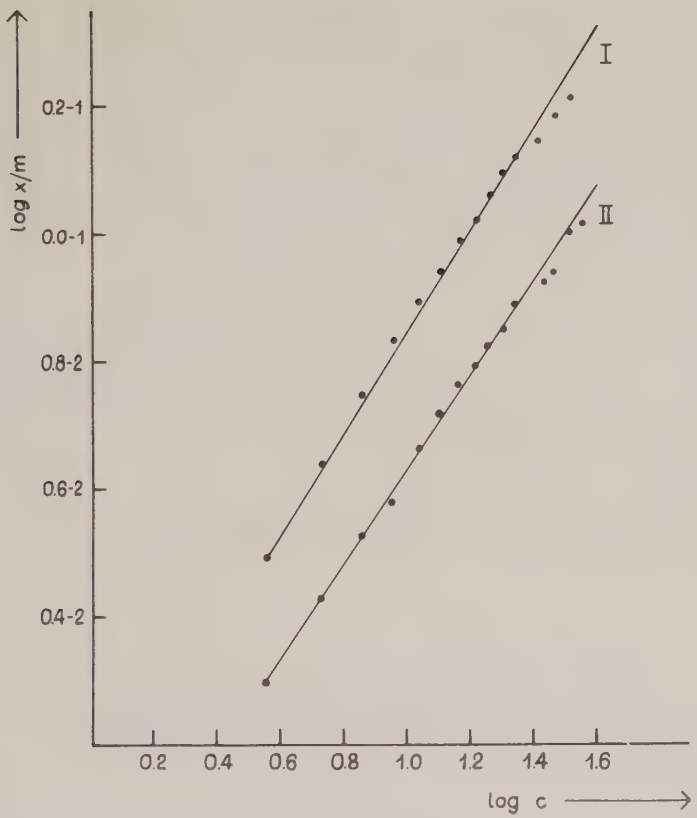


Abb. 6

Graphische Prüfung auf Erfüllung der Adsorptionsgleichung nach FREUNDLICH für die Adsorption von Methysticin (I) und Dihydromethysticin (II) gelöst in Methylenchlorid an Aktivkohle.

Eine gute Übereinstimmung zwischen den experimentellen Befunden und den berechneten Werten besteht allerdings nur innerhalb des Konzentrationsbereiches von 100 bis ca. 600 mg%; oberhalb dieser Grenze ist die tatsächliche Adsorption geringer, als nach der FREUNDLICHschen Beziehung erwartet wird. Darin kommt zum Ausdruck, daß die Annäherung an einen Grenzwert für x/m in dem der Oberflächensättigung nahen Konzentrationsbereich in der Gleichung unberücksichtigt bleibt.

Die Gleichung nach LANGMUIR:

$$x/m = K \frac{c}{c + a}$$

trägt diesem Umstand dadurch Rechnung, daß mit dem Faktor K die maximale Beladungsfähigkeit des Adsorbens in die Beziehung eingeht.
Im Bereich sehr kleiner Konzentrationen verläuft die LANGMUIRsche Adsorptionsisotherme annähernd linear mit der Steigung $\frac{K}{a}$:

$$x/m = K \frac{c}{a} \qquad (c \lll a).$$

Mit steigendem Wert für c vermindert sich jedoch die differentielle Zunahme der Adsorptionsquote, und x/m nähert sich schließlich asymptotisch einem Grenzwert, der der maximalen Aufnahmekapazität des Adsorbens (= K) entspricht.

Auch die Erfüllung der Adsorptionsgleichung nach LANGMUIR läßt sich durch eine graphische Darstellung prüfen, indem die reziproken Werte für x/m und c gegeneinander aufgetragen werden. Die Punkte müssen auf einer Geraden liegen, die der Gleichung in der Umformung:

$$\frac{1}{x/m} = \frac{a}{K \cdot c} + \frac{1}{K}$$

entspricht.

Abb. 7 zeigt, wiederum für die beiden Substanzen M und DHM, daß das adsorptive Verhalten dieser Verbindungen an Aktivkohle im gesamten geprüften Konzentrationsbereich der LANGMUIRschen Beziehung folgt.

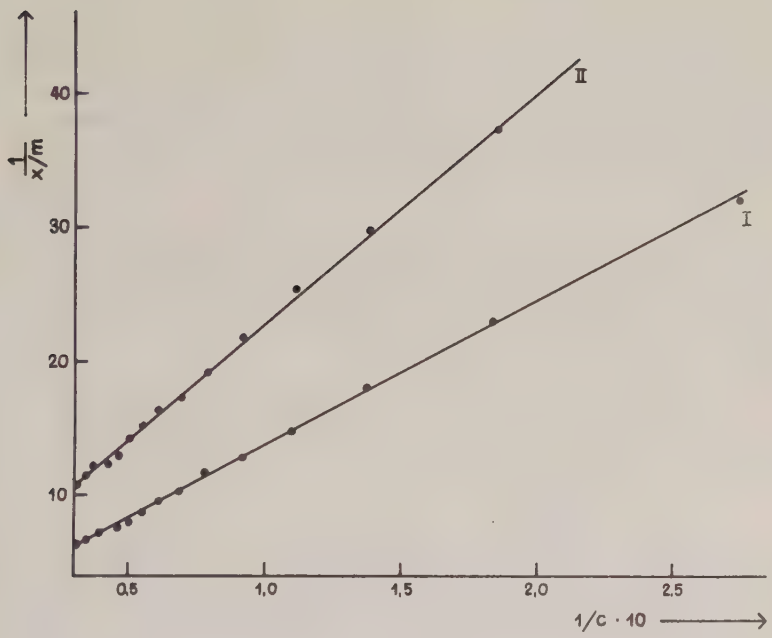


Abb. 7

Graphische Prüfung auf Erfüllung der Adsorptionsgleichung nach LANGMUIR für die Adsorption von Methysticin (I) und Dihydromethysticin (II) gelöst in Methylenchlorid an Aktivkohle.

c) Berechnung der Adsorptionsisotherme für p-Methoxykawain.

Bei der experimentellen Bestimmung der Adsorptionsisothermen hatten wir die Verbindung p-Methoxy-K (MK) auslassen müssen, weil uns die erforderliche, relativ große Substanzmenge nicht zur Verfügung stand. Nachdem wir die Adsorptionsbeziehung nach FREUNDLICH für das Verhalten der Kawalactone in unserem System erfüllt fanden, konnte der Verlauf der zugehörigen Isothermen rechnerisch ermittelt werden.

Zur Berechnung der Konstanten k und 1/n in der FREUNDLICHschen Gleichung dienten uns drei gemessene x/m-Werte für MK bei den Lösungskonzentrationen: c = 204, 298 und 400 mg%. Sie wurden nach der vorher beschriebenen Methode als Mittelwerte aus jeweils drei Versuchen bestimmt zu:

c = (mmol/l)	$x/m \cdot 10^{-2}$ = (mmol/g)
7,85 (204 mg%)	5,75
11,45 (298 mg%)	7,61
15,38 (400 mg%)	9,50

Die Werte der zugehörigen Systemkonstanten k und 1/n betragen danach:

$$k = 1{,}240 \cdot 10^{-2} ;$$
$$1/n = 0{,}745 .$$

Um die Lage der berechneten Isothermen von MK im Verhältnis zu denen der anderen Lactone zu veranschaulichen, wurde die Kurve in die Isothermenschar der Abb. 4 eingefügt.

d) Bestimmung der eluotropen Reihe organischer Lösungsmittel an Kohle.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Adsorption gelöster Substanzen entscheidend mitbestimmt wird durch das Lösungsmittel und daß daher der Wert x/m nur für ein bestimmtes System, zu dem Adsorbens, Sorbend und Lösungsmittel gehören, Gültigkeit besitzt. Vergleicht man die im Adsorptionsgleichgewicht aus verschiedenen Lösungsmitteln gebundenen Substanzmengen, so gibt ihr Verhältnis ein Maß für die relative Verdrängungspotenz der Solventien.

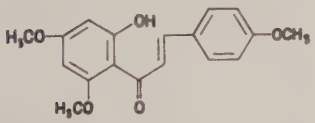
Wir fanden für eine Reihe geprüfter Lösungsmittel die folgende Verdrängungsreihe geordnet nach sinkender Elutionskraft:

Chloroform › Methylenchlorid › 1,2-Dichloräthan › Benzol › Aceton › Essigester › Äthanol.

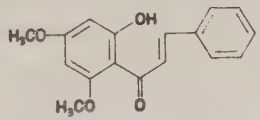
Bei Variation des Sorbenden erwies sich die angegebene Rangfolge gegenüber fünf geprüften Substanzen als konstant; verglichen wurde die Adsorptivität von jeweils drei Vertretern des gleichen Substitutionstyps (DHM, DeDiM, M) sowie drei Vertretern des gleichen Hydrierungstyps (DHK, THY, DHM).

e) Zum adsorptiven Verhalten von F l a v a n o n e n und D i h y d r o c h a l k o n e n.

Während die beiden Chalkone Flavokawin A und B



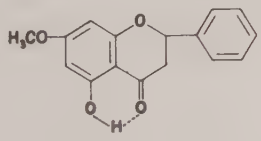
Flavokawin A



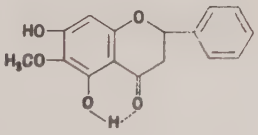
Flavokawin B

selbst durch einen großen Überschuß an Chloroform nicht aus ihrer adsorptiven Bindung an Aktivkohle zu verdrängen sind, zeigte sich im Verlauf von Untersuchungen an einer anderen Pfefferart in unserem Institut, daß die beiden Flavanone Dihydrotectochrysin (I) (= opt. inaktives Pinostrobin) und Dihydro-Oroxylin A (II) mit Methylenchlorid leicht eluiert werden (Sauer u. Hänsel i.Vorb.).

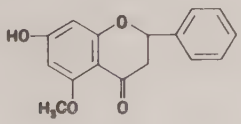
(I)



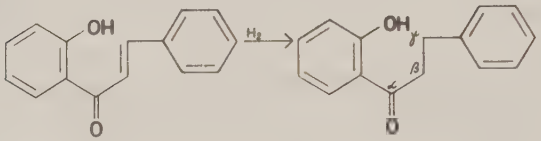
(II)



(III)



Im Zusammenhang mit dieser Beobachtung interessierten wir uns auch für das Verhalten von ß,γ-Dihydrochalkonen.
Aufgrund der bisherigen Untersuchungsbefunde konnte angenommen werden, daß eine Unterbrechung des durchkonjugierten Systems durch Absättigung der Doppelbindung im aliphatischen Teil eines Chalkons ebenfalls von einer erheblichen Minderung der Adsorptivität bei den Dihydro-Derivaten begleitet sein würde.



Eine entsprechende Erscheinung wurde bei den Lactonkörpern bereits beobachtet in der starken Abnahme der Haftfähigkeit der Styryl-α-pyrone im Vergleich zu ihren korrespondierenden Phenyläthylderivaten.

Um das vermutete Verhalten von Dihydrochalkonen experimentell zu beweisen, wurde eine kleine Modellkohlesäule (Ø = 2,0 cm; Füllhöhe = ca. 12 cm entsprechend 10 g Adsorbens) mit einem Gemisch aus jeweils 10 mg Dihydroflavokawin A, Dihydroflavokawin B, dem Flavanon Alpinetin (III) sowie Methysticin als Indikatorsubstanz beschickt. Wegen der geringen Benzollöslichkeit des mitgeprüften Flavanons verbot sich die Anwendung dieses Lösungsmittels zur Chromatographie, wir eluierten daher mit Methylenchlorid.
Das Eluat wurde in Fraktionen von jeweils ca. 10 ml gesammelt, die wir nach dem Einengen im Vacuum dünnschichtchromatographisch auf das Vorkommen der vier aufgegebenen Substanzen prüften (DC auf Kieselgel G - Platten, Entwicklung mit Cyclohexan: Essigester 1:1, v/v).
Nach Durchlauf von etwa 600 ml waren sowohl die beiden Dihydrochalkone als auch das Flavanon im Eluat nachweisbar, während Methysticin erst in späteren Fraktionen, entsprechend einem Gesamtelutionsvolumen von ca. 1200 ml auftrat.

AUSWERTUNG und DISKUSSION der ERGEBNISSE aus TEIL I.

Unterschiede im adsorptiven Haftvermögen chemischer Verbindungen sind bereits sehr früh methodisch ausgenutzt worden, um durch die selektive Bindung von unerwünschten Begleitstoffen an oberflächenaktives Material Reinigungseffekte zu erzielen. In diesem Sinne hat sich Aktivkohle besonders zur Eliminierung von aromatischen Kohlenwasserstoffen aus Flüssigkeiten und Gasen bewährt. Die Bedeutung dieses Anwendungsbereiches für Adsorptionsmittel in der technischen Chemie beleuchtet u.a. eine Patentanmeldung aus dem Jahre 1958, in der ein Verfahren geschützt wird, Industriegase, Abwässer, Tabakrauch und ähnliches von höher annellierten Aromaten zu reinigen, indem diese selektiv an Graphit adsorbiert werden (DAS 1 021 840).

Im Gegensatz zum adsorptiven Reinigungsvorgang, welcher relativ grobe Unterschiede der Adsorptivität bei den zu trennenden Komponenten eines Stoffgemisches voraussetzt, gelingt es bei der chromatographischen Adsorptionsanalyse, auch extrem geringe Abweichungen im Haftvermögen von ähnlich gebauten Körpern in Erscheinung treten zu lassen und zu ihrer gegenseitigen Abtrennung zu nutzen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, die Wirkung einer Vielzahl von sehr kleinen, sich wiederholenden Einzelvorgängen (im speziellen Falle Ad- und Desorptionsvorgängen) zu einem integrierenden Gesamteffekt zusammenzufassen, in welchem sich das spezifische Verhalten einer Verbindung zu erkennen gibt.

Unter den zur chromatographischen Analytik eingesetzten Adsorptionsmitteln hat Aktivkohle bisher nur wenig Bedeutung erlangt. Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen zur säulenchromatographischen Trennung verschiedener Stoffgemische betreffen ausschließlich Substanzen von ausgeprägt polarem Charakter wie Kohlenhydrate, Aminosäuren und Fettsäuren. Sinngemäß wurde in diesen Fällen stets mit hydroxylhaltigen Lösungsmitteln, zumeist Äthanol-Wasser-Gemischen, eluiert (Cassidy 1940; Cassidy u. Wood 1941; Tiselius 1947; Tiselius, Drake u. Hagdahl 1947; Canson u. Gillies 1955).

Wir hatten uns die Aufgabe gestellt, quantitative Unterschiede in der Adsorptivität von wenig oder nicht polaren a r o m a t i s c h e n Stoffen gegenüber Aktivkohle in Abhängigkeit von der chemischen Konstitution dieser Verbindungen zu untersuchen. Als Modellsubstanzen diente dabei eine Gruppe natürlich vorkommender Inhaltsstoffe aus Piper methysticum sowie einige synthetisch zugängliche Verbindungen des gleichen Bautyps, d.h. durch Substitution am aromatischen Ring und durch schrittweise Absättigung der Doppelbindungen $\Delta 5$ und $\Delta 7$ abgeleitete Derivate des 4-Methoxy-6-styryl-α-pyrons.

Anhand der gewonnenen Untersuchungsbefunde kann ein allgemeiner und u. W. bisher nicht bekannter Anwendungsbereich für Aktivkohle beschrieben werden: Der Einsatz zur säulenchromatographischen Vor- bzw. Auftrennung von lipoidlöslichen Pflanzenextrakten.

Beziehung zwischen chemischer Konstitution und adsorptivem Haftvermögen.

Aus den Ergebnissen einer säulenchromatographischen Analyse des Kawaauszugs an Aktivkohle sowie aus der Kenntnis der Adsorptionsisothermen von 12 Modellsubstanzen ist abzuleiten, daß innerhalb der untersuchten Stoffgruppe ein regelmäßiger Zusammenhang zwischen der chemischen Konstitution einer Verbindung und ihrer Adsorptivität an Aktivkohle besteht. Dieser Zusammenhang ist allgemein als Proportionalität zwischen "polaritätsverstärkenden" Strukturelementen und der adsorptiven Haftfestigkeit einer Verbindung zu charakterisieren. Dabei verstehen wir unter "polaritätsverstärkenden" Faktoren alle Kriterien, die die Delokalisierbarkeit von Elektronen innerhalb des Moleküls begünstigen.

Im Einzelnen kam an den von uns untersuchten Substanzen der Einfluß von vier solchen Faktoren zur Beobachtung:

1. Die zunehmende Ausdehnung eines - von einem Benzolkern ausgehenden - Konjugationssystems, (5,6-Dehydrolactone, Chalkone);
2. die zunehmende Anzahl aromatischer bzw. pseudoaromatischer Ringe im Molekül, (Chalkone, Dihydrochalkone, 7,8-Dihydrolactone);

3. die Einführung nicht-aromatischer Doppelbindungen, (7, -Dihydrolactone, Dihydrochalkone);

4. die Einführung alkylierter Sauerstoffunktionen in den Phenylrest, (betr. die vier Hydrierungsstufen aller Kawalactone).

Tab. 4 zeigt für eine Reihe von Naturstoffen die von uns gefundene und durch Ergebnisse anderer Untersucher bestätigte Abhängigkeit der Adsorptivität an Aktivkohle von den unter Punkt 1 bis 3 genannten Faktoren; (zum Verhalten von Flavanonen: Sauer u. Hänsel z.Zt. in Vorb.; zum Verhalten von Cubebin: Hänsel u. Klaproth 1966).

Hinsichtlich des Einflusses von sauerstoffhaltigen Substituenten am Phenylrest der Kawalactone ist der Isothermenschar in Abb. 4 folgende Gesetzmäßigkeit zu entnehmen: In allen Hydrierungsstufen, d.h. wenn man Verbindungen gleicher Sättigung miteinander vergleicht, führt die Anwesenheit alkylierter Hydroxylgruppen zu einer schrittweisen Steigerung der Adsorptionsbereitschaft von den unsubstituierten über die Methoxyl- zu den Dioxymethylenderivaten. Verglichen mit dem Effekt von konjugierten Doppelbindungen ist dieser Faktor jedoch nur wenig einflußreich.

Anwendungsbereich für Aktivkohle als Adsorbens in der Säulenchromatographie.

Die spezifischen Eigenschaften und - daraus folgend - der bevorzugte Anwendungsbereich für das von uns untersuchte Adsorptionsmittel können am besten verdeutlicht werden an einer Gegenüberstellung der Elutionsfolgen für die Inhaltsstoffe des Kawaextraktes an Aktivkohle (s. Tab. 1, S. 29) mit den entsprechenden Befunden bei einer säulenchromatographischen Auftrennung an Kieselgel. Für die in Tab. 5 wiedergegebene Analyse von 6 g Kawaextrakt wurde der besseren Trennqualität wegen Kieselgel H für die Dünnschichtchromatographie (Merck) als Füllmaterial verwendet.

Verbindgs.-typ	Relative Ads.-bereitschaft	Adsorptionsbeeinflussende Faktoren		
		Zahl arom./(pseud.-aromat.) Ringe	Länge des Konj.-systems an 1 Benzolkern	Zahl nicht-aromatischer Doppelbindungen
Fette, Phytosterine	---	0	0	0
Lignane [1]	+	2	0	0
Tetrahydro-Kawalactone	+	1	0	2
Flavanone [2]	++	2	1	1
Dihydro-chalkone [3]	++	2	1	1
7,8-Dihydro-Kawalactone	+++	1 / (1)	0	3
5,6-Dihydro-Kawalactone	+++	1	1	3
5,6-7,8-Dehydro-Kawalactone	++++	1 / (1)	4	4
Chalkone [4]	+++++	2	5	2

Tab. 4 Beziehung zwischen Molekülbau und Adsorptivität an Aktivkohle.

Erklärungen zu 1) - 4): Ergebnisse liegen für folgende Vertreter der genannten Verbindungstypen vor:
1): (3,4),(3',4')-Bismethylendioxy-9'-hydroxy-9,9'-epoxylignan (= Cubebin);
2): 5-Hydroxy-7-methoxyflavanon (= Dihydrotectochrysin), 5-Methoxy-7-hydroxyflavanon (= Alpinetin) und 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavanon (= Dihydrooroxylin A);
3): ß,*r*-Dihydroflavokawin A und - B;
4): 6'-Hydroxy-2',4',4-trimethoxychalkon (= Flavokawin A) und 6'-Hydroxy-2',4'-dimethoxychalkon (= Flavokawin B).

Elutionsmittel	Frakt. Nr.	Vol. (ml)	Rohrückstd. (g)	DC-nachgewiesene Substanzen
Cyclohexan : Essigester 6 : 4	0	575	0,015	frontnahe Flecke unbekannter Zuordnung
	I	370	0,125	Fl.B, A
	II	185	0,045	Fl. A, DesY
	III	300	0,410	DesY, Y
	IV	95	0,230	DesY, Y, DHK
	V	420	2,525	Y, DHK, K, (DHM), THY
	VI	140	0,975	Y,(DHK),K, DHM , THY
	VII	150	0,365	(Y), (K), DHM , THY, MK, M
	VIII	375	0,775	(Y), (K),(DHM),(THY),MK, M
	IX	1580	0,150	(Y), (M), xg
Gesamt:		4190 ====	5,615 =====	

Gesamtrückgewinn: 5,615 g = 93,6 % des eingesetzten Extraktes.

Tab. 5

Säulenchromatographische Analyse von 6,0 g Methylenchloridextrakt aus Kawarhizom an Kieselgel H (Merck).

(Säulendurchmesser = 4,5 cm; 300 g Adsorbens; Tropfgeschw. = ca. 1,5 ml/min).

Die gegensätzliche Adsorptionscharakteristik der beiden Systeme gibt sich zu erkennen in einem besonders empfindlichen Ansprechen auf Unterschiede im S ä t t i g u n g s g r a d der Sorbenden bei Aktivkohle, während die Haftfestigkeit an Kieselgel wesentlich stärker durch die Anzahl vorhandener S a u e r s t o f f - Funktionen sowie durch den r ä u m l i c h e n B a u des Moleküls bestimmt wird.

Ähnlich wie für Kieselgel sind auch für die meisten anderen zur Chromatographie gebräuchlichen Adsorbentien (z.B. Kieselgur und Aluminiumoxyd) Hydrophilitätsunterschiede der Sorbenden das entscheidende Kriterium, das ihre differente Wanderungsgeschwindigkeit bedingt. Mit diesen Adsorptionsmitteln gelingt es jedoch nur unzureichend, eine Gruppe von mehr oder minder hydrophoben Pflanzenaromaten aufzutrennen, die sehr häufig in den - mit hydroxylfreien Lösungsmitteln gewonnenen - Extrakten aus Drogenmaterial anzutreffen sind. Die Gruppe umfaßt alle sekundären Pflanzenstoffe gemischt aliphatisch-aromatischen Charakters wie z.B. die Kumarine, Flavonoide, Stilbene oder Lignane, soweit sie nicht an Zucker gebunden bzw. ihre Hydroxyl- oder Carboxylgruppen durch Äther- oder Esterbildung verschlossen sind, oder deren aromatischer Ring mit hydrophoben, z.B. isoprenoiden Gruppen substituiert ist.

Aktivkohle eignet sich aufgrund ihrer spezifischen, von anderen Adsorbentien abweichenden Eigenschaften einerseits besonders gut zur säulenchromatographischen Vortrennung solcher komplex zusammengesetzten "lipophilen Pflanzenextrakte" in drei Fraktionen:

1. Rein aliphatisch-alicyclischen Komponenten (Aceton- oder Essigestereluat);
2. aromatische Verbindungen mit 1 bis 2 Benzolkernen im Molekül, die jedoch nicht annelliert oder durch ein Konjugationssystem verbunden sein dürfen - z.B. Verbindungen vom Typus der Lignane - (Benzoleluat);
3. Aromaten mit einer konjugierten Seitenkette über 2 bis 4 C-Atome (Chloroform- oder Methylenchlorideluat).

Durchkonjugierte Systeme von größerer Ausdehnung - z.B. Chalkone, Flavone u.ä. - werden unter den beschriebenen Bedingungen nicht desorbiert.

Die praktischen Einsatzmöglichkeiten für Aktivkohle ergeben sich darüberhinaus aus der Tatsache, daß der Trenneffekt zwischen Verbindungen gleicher Grundstruktur aber unterschiedlichen Sättigungsgrades bei weitem die mit anderen Adsorbentien erreichbare Trennqualität für solche Stoffe übertrifft.

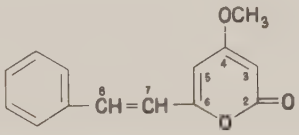
Die adsorptionschromatographische Analyse lipoidlöslicher Pflanzenauszüge an Aktivkohle kann daher - wie wir an den Beispielen der erstmaligen Isolierung von p-Methoxykawain und dem Nachweis von Tetrahydroyangonin in Piper methysticum im II. Teil der vorliegenden Arbeit zeigen - die methodische Voraussetzung zur Erfassung von Naturstoffen liefern, deren Vorkommen in biologischem Material außerordentlich stark hinter dem mengenmäßigen Anteil von ähnlich gebauten Verbindungen zurücktritt.

II. HAUPTTEIL

A) Einsatz von Aktivkohle als Adsorbens zu einer qualitativen Nachuntersuchung des lipophilen Kawaextraktes

1) Ausgangssituation aufgrund der Befunde aus Teil I.

Der Methylenchloridauszug aus dem Rhizom von Piper methysticum enthält als mengenmäßigen Hauptbestandteil eine Gruppe monocyclischer α-Pyronderivate, deren gemeinsame Grundstruktur das 4-Methoxy-6-styryl-α-pyron ist.



Es ist bereits gezeigt worden, daß dieses Grundskelett je nach der Substitution durch Methoxyl- oder Dioxymethylengruppen in Stellung 11 und 12 und zusätzlich durch Absättigung der Doppelbindungen Δ5 und Δ7 zu insgesamt zwölf chemischen Individuen ausgestaltet werden kann, die sich ihrerseits nach dem jeweiligen Hydrierungsgrad in vier Gruppen einteilen lassen:

a) die 6-Styryl-a-pyrone (DesY, Y, DeHM),
b) die 6-Styryl-5,6-dihydro-α-pyrone (K, MK, M)
c) die 6-Phenyläthyl-α-pyrone (DeDiK, 7,8-DHY, DeDiM)
d) die 6-Phenyläthyl-5,6-dihydro-α-pyrone (DHK, THY, DHM).

Von diesen zwölf möglichen Strukturvarianten waren zu Beginn unserer Arbeit sechs als Inhaltsstoffe der Kawadroge bekannt. Die Tatsache, daß es sich bei diesen sechs Naturstoffen um jeweils zwei Vertreter der oben mit a, b, d bezeichneten Gruppen handelt und daß in jeder Gruppe e i n e s der drei möglichen Substitutionsmuster n i c h t verwirklicht ist, erschien uns im Hinblick auf einen einheitlichen Biogeneseweg der Kawalactone auffallend.

Das weitere Ziel unserer im ersten Teil beschriebenen adsorptionsanalytischen Untersuchungen an dieser Stoffgruppe war daher, das Verhalten derjenigen Substanzen kennenzulernen, deren natürliches

Vorkommen in Piper methyst. bisher nicht beschrieben wurde, um bei einer qualitativen Nachuntersuchung des Kawaextraktes gezielt nach diesen Verbindungen, den sogenannten "missing links", zu suchen.

Die Ergebnisse der vorausgegangenen Prüfung liefern zur Lösung dieser Aufgabe die folgenden Voraussetzungen:

a) Es hat sich gezeigt, daß die Anwendung von Aktivkohle als Adsorbens bei der Elution mit Benzol oder MCl für einen Teil der Kawalactone eine feinere Auftrennung zuläßt, als dies mit den bisher gebräuchlichen Adsorbentien möglich war.

b) Aufgrund der Kenntnis der Adsorptionsisothermen - und damit der Elutionsfolge - für sämtliche zwölf Verbindungen kann die Möglichkeit des Auftretens für die gesuchten Stoffe auf bestimmte Fraktionen des säulenchromatographischen Eluats begrenzt werden.

c) Die Möglichkeit, DeHM im Eluat der Kohle-Säule nachzuweisen, kann infolge der besonders ausgeprägten Haftfähigkeit dieser Verbindung ausgeschlossen werden. Zur Prüfung auf das Vorkommen von DeHM in der Kawadroge mußte daher eine andere Untersuchungsmethode herangezogen werden (s. S.*64*).

2) <u>Voruntersuchungen zum analytischen Nachweis der gesuchten Substanzen.</u>

Da die Adsorptionsisothermen sämtlicher Verbindungen mehr oder weniger parabelförmige Verlaufsformen aufweisen, mußten wir damit rechnen, in den Eluatfraktionen stets Gemische aus mehreren Stoffen aufzufangen. Die daraus folgende Forderung nach einem empfindlichen Verfahren zum analytischen Nachweis der gesuchten Substanzen neben den bereits bekannten bestand um so mehr, als für ihr mengenmäßiges Hervortreten wenig Wahrscheinlichkeit gegeben war.

Bei der Ausarbeitung einer Nachweismethode konnten wir uns dem üblichen Weg, die SC-Trennergebnisse auf die Verhältnisse an der DC-Platte zu übertragen, nur bedingt anschließen.

E. Stahl (Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag 1962) zitiert zwar eine von Hesse und Alexander angegebene Technik, um Substanzflecke auch auf dunklen Sorptionsschichten wie Kohle oder Eisenoxyd erkennbar zu machen. Danach wird eine Kieselgel G-Ligroin-Suspension mittels Zerstäuber fein auf die trockene, entwickelte Platte aufgesprüht. Auf der so erhaltenen weißen Oberschicht sollen die Flecke nach der üblichen Behandlung mit Sprühreagentien sichtbar werden.

Da die Kawalactone nur teilweise eine ausgesprochene Farbreaktion mit dem Sprühmittel eingehen, (der größere Teil der Substanzflecke erscheint beim anschließenden Betrachten im UV-Licht dunkel), reichte die mit diesem Verfahren erzielbare Erfassungsgenauigkeit für unsere Zwecke nicht aus. Wir waren daher gezwungen, zur analytischen Untersuchung der Eluatfraktionen auf ein anderes chromatographisches System überzuwechseln.

Hänsel u. Rimpler (1965) beschrieben bereits eine dünnschichtchromatographische Methode zur Auftrennung der hier behandelten C-6-substituierten 4-Methoxy-α-pyrone. Beim Variieren der Versuchsbedingungen fanden die Autoren, daß "die Trenneffekte mit sinkender Aktivität des Sorptionsmittels besser werden", - eine Beobachtung, die mit unserem Befund übereinstimmt, daß die optimale Trennqualität beim präparativen Arbeiten an der desaktivierten, d.h. mit organischen Lösungsmitteln vorbehandelten Aktivkohle erreicht wird. - Die Autoren fanden in dem polymeren organischen Kunststoff Polyacrylnitril (Farbenfabriken Bayer AG.) ein brauchbares Sorptionsmittel, an welchem bei der Entwicklung mit Cyclohexan-Essigester-Mischungen befriedigende Trennungen erreicht werden. Allerdings war es notwendig, die Entwicklung nach der sogenannten Keilstreifentechnik (Stahl 1962) vorzunehmen, wobei der gesamte Plattenbelag in die Form eines großen gleichschenkligen Dreiecks gebracht wird, auf dessen Spitze lediglich e i n e Untersuchungsprobe aufzutragen ist, um so die Substanzen zur Wanderung in der gewünschten bandförmigen Zonenverbreiterung zu zwingen. Darüberhinaus mußte jede Platte entweder dreimal nacheinander (iterierend) in einer normalen Trogkammer, oder fünf Stunden lang in der zur Durchlauf-Dünnschichtchromatographi bestimmten BN-Kammer (Fa. Desaga) entwickelt werden.

Wir konnten das beschriebene Verfahren durch eine Variation des Laufmittels insofern verbessern, als wir beim Ersetzen der Essigesterkomponente durch den stärkeren Protonendonator Malonsäurediäthylester (1 Vol.teil + 9 Vol.teile Cyclohexan) auch bei normaler Entwicklung in der mit dem Fließmittel gesättigten Kammer gleichwertige Trennwirkungen erhielten. Da es somit möglich ist, eine größere Probenzahl auf eine Platte aufzubringen und direkt miteinander zu vergleichen, darf die abgewandelte Methode als erhebliche Verbesserung der Untersuchungstechnik angesehen werden.

Die Substanzflecke geben sich nach dem Entwickeln der DC-Platte im kurzwelligen UV-Licht (260 nm) als dunkle Zonen zu erkennen. Zu ihrer genaueren Differenzierung wird mit Phosphorsäure-Anisaldehyd-Lösung (= Mischung von 5 T. Orthophosphorsäure, 5 T. Anisaldehyd und 90 T. Äthanol) besprüht und die Platte etwa 10 Minuten lang auf 110° erhitzt. Die Verbindungen zeigen danach unter der UV-Beleuchtung folgende Fluoreszenzfarben:

DHK, THY, DHM	=	dunkelgrau bis blaugrau,
K, MK	=	rot,
M	=	orange,
DesY	=	olivgrün,
Y, DeHM	=	grüngelb bis gelb.

Die 5,6-De-7,8-dihydro-Derivate sind zunächst nicht gefärbt, sie lassen sich jedoch durch zusätzliches Nachbesprühen mit Phosphormolybdänsäure-Reagens (= frisch bereitete 5 %ige Lösung von Phosphormolybdänsäure in 95 %igem Äthanol) als gelbe Flecke unter dem UV-Licht sichtbar machen.

3) Untersuchungsmaterial und -methode

In die qualitative Inhaltsprüfung wurde Drogenmaterial verschiedener Herkunft einbezogen und zwar:

a) Rhiz. Piperis methystic., Handelsware, bezogen durch die Fa. E.F. Steinmetz, Drogengroßhandlung, Amsterdam;

b) Rhizom- und Sproßteile von Kawapflanzen der Südsee-Insel Big Hawai (Gegend von Puna), die von R. Hänsel anläßlich eines Forschungsaufenthaltes an der University of Hawai im Juli 1961 gesammelt wurden;

c) Rhizom von Kawapflanzen der Fidschi-Inseln (Suwa);

d) Rhizom von Kawapflanzen der Insel Samoa (Pago Pago).

Bei den oberirdischen Teilen der Hawai-Droge nahmen wir eine Trennung in Mark und markfreie Stengelanteile vor. Die vergleichende Prüfung der beiden Proben sollte Aufschluß darüber geben, ob das Stengelmark die gleichen Inhaltsstoffe führt wie die als Genußmittel bei den Südsee-Insulanern bevorzugten unterirdischen Pflanzenteile. Anlaß zu dieser Fragestellung gab ein Hinweis von Prof. Scheuer, wonach den zur Mormonensekte übergetretenen Einwohnern Samoas das Kauen von Kawa-M a r k gestattet ist, während sie sich jeder anderen Art von Genußmittelgebrauch - einschließlich des rituellen Kawa-Trinkens - aus religiösen Gründen zu enthalten haben.

Vorausgegangene dünnschichtchromatographische Vergleichsuntersuchungen des Marks und der gesamten Sproßteile, die 1961 von Hänsel (unveröffentlicht) in Hawai durchgeführt worden waren, hatten keinen Anhaltspunkt dafür geliefert, daß in der Wirkstoffzusammensetzung zwischen ober- und unterirdischen Pflanzenmaterial qualitative Unterschiede bestehen. Es war nun zu prüfen, ob sich diese Befunde auch bei Einsatz der empfindlicheren neuen Untersuchungstechnik bestätigen ließen, oder ob die lactonischen Substanzen möglicherweise ausschließlich bzw. bevorzugt in den Gefäß- und Rindengeweben des Sprosses lokalisiert sind.

Herrn Prof. Dr. R. Hänsel sowie Herrn Prof. Dr. P.J. Scheuer, chairman Chemistry Department der Universität Hawai, der uns entgegenkommenderweise die Vergleichsproben anderer geographischer Herkunft zur Verfügung stellte, danke ich aufrichtig für die Überlassung des Materials.

Wir extrahierten die lufttrockenen, mittelfein gemahlenen Drogen mit Methylenchlorid im Soxhlet-Apparat bis das abfließende Lösungsmittel vollständig farblos war (bei Einsatz von 300 g Rhizompulver und ca. 1 l Solvens etwa 10 Stunden). Der Extrakt wurde im Vacuum vom Lösungsmittel befreit und anschließend unter Rückfluß so lange mit siedendem Äther behandelt, bis das gesamte Material gelöst war.

Aus der ätherischen Lösung schieden sich bereits beim Abkühlen kristalline Bestandteile aus, von denen nach 24 Stunden abdekantiert wurde. Das Kristallgemisch (= Fraktion A) besteht laut dc-Prüfung ausschließlich aus Y und M mit geringfügigen Beimischungen von K und DHK; auffallende neue Chromatogrammflecke wurden nicht beobachtet.

Die ätherlösliche Fraktion (= B) wurde erneut durch Vacuumdestillation vom Lösungsmittel befreit, der Rückstand in wenig Benzol aufgenommen und auf eine Kohlesäule gegeben.

Tab. 6 gibt eine Übersicht über die aus den verschiedenen Untersuchungsproben gewonnenen Extraktausbeuten.

Droge	Rohextrakt	Fraktion A (Rohkrist.a.Äther)	Fraktion B (ätherlsl.Teil)
Hawai Rhizom*)	9,6	3,0	5,9
Fidschi Rhiz.	5,3	1,1	3,9
Samoa Rhizom	5,9	0,9	4,8
Hawai marklose Stengel	3,7	0,7	3,0
Hawai Stengelmark	2,3	0,3	1,9

*) betrifft das direkt aus dem Herkunftsland bezogene Material

Tab. 6 Ausbeuten an Rohextrakt sowie an den Extraktfraktionen A und B aus unterschiedlichem Drogenmaterial. (Zahlenangaben = % der eingesetzten Droge)

Die Größe der zur Aufarbeitung verwendeten Kohlesäulen wurde jeweils der Menge an aufgegebenem Trenngut angeglichen, wobei das Verhältnis von Adsorbens zu Extrakt etwa 10:1 und die Höhe der zu durchwandernden Schicht ca. 20 bis 25 cm betrug. Als Elutionsmittel diente zunächst Benzol, erst mit dem Auftreten von Methysticin im Auslauf (Nachweis durch die Tüpfelprobe: M reagiert mit H_2SO_4 conc. unter violetter Färbung) wurde Methylenchlorid als stärker desorbierendes Lösungsmittel eingesetzt. Das kontinuierlich auslaufende Eluat sammelten wir auf dem Fraktomaten in Anteilen von jeweils ca. 15 ml.

4) Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennung.

a) Analytischer Nachweis von p-Methoxykawain und Tetrahydroyangonin.

Die dünnschichtchromatographische Prüfung ergab für die fünf untersuchten Proben verschiedener Herkunft qualitativ übereinstimmende Befunde, wonach folgende Inhaltsstoffe identifiziert werden konnten:

Fraktion	I	:	DHK
	II	:	DHK, K
	III	:	DHK, THY, K
	IV	:	DHK, THY, K, DHM
	V	:	MK, M (neben kleinen und abnehmenden Mengen der 4 o.g. Substanzen)
	VI	:	vorwiegend M.

N i c h t nachweisbar waren die Verbindungen DeDiK, 7,8-DHY und DeDiM.
(Die Volumina der Sammelfraktionen I - VI wechselten je nach der Menge an aufgegebenem Untersuchungsmaterial).

Die analytische Erfassung der beiden bisher nicht als natürliche Kawastoffe nachgewiesenen Lactone THY und MK (= 5,6-DHY) geht aus der Wiedergabe eines Dünnschichtchromatogramms in Abb.8 hervor. Die Platte wurde zweidimensional entwickelt; als Vergleichsprobe lief in einer Richtung das Gemisch der sechs Substanzen mit.

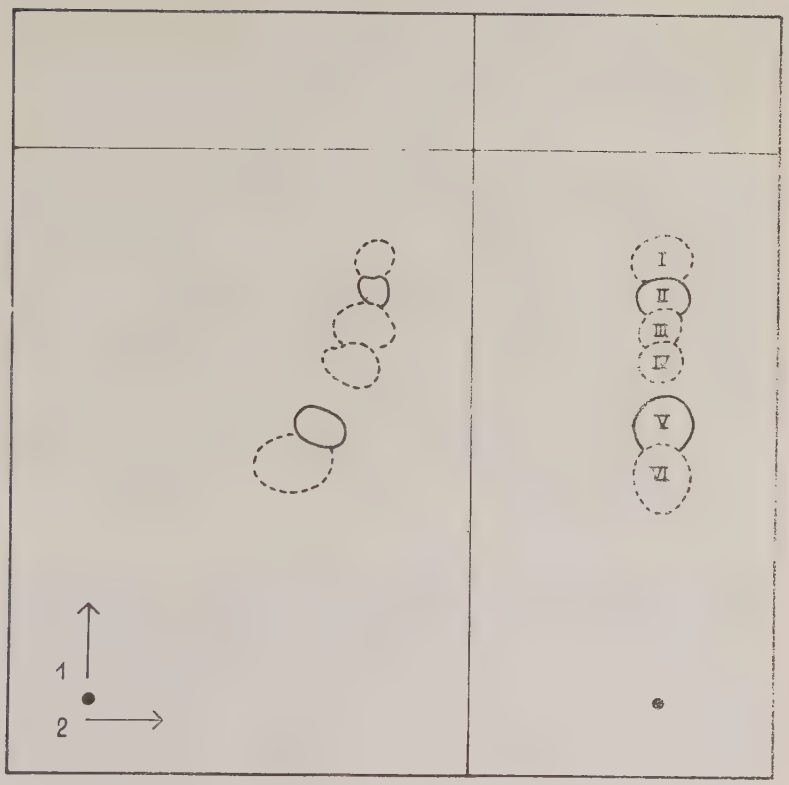


Abb. 8 Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der Kohlesäuleneluatfraktion Nr. V von der Hawai-Rhizomdroge.
(Plattenbelag: Polyacrylnitril, Laufmittel 1 u. 2 : Cyclohexan - Malonester 9:1, v/v).

I = Dihydrokawain
II = Tetrahydroyangonin
III = Kawain
IV = Dihydromethysticin
V = p-Methoxy-Yangonin
VI = Methysticin

b) Isolierung und Identifizierung von p-Methoxykawain.

Die präparative Gewinnung der Verbindung durch Säulenchromatographie an Aktivkohle erwies sich aus zwei Gründen als schwierig: Die Substanz ist zu einem vergleichsweise sehr geringen Anteil im Extrakt enthalten und läßt sich nicht ohne weiteres mit der erforderlichen Trennschärfe von den vorlaufenden Stoffen DHK, THY, DHM und K abtrennen.

Wir versuchten daher zunächst, die Trennqualität durch Verwendung anderer Adsorbentien zu verbessern. Entsprechende Prüfungen an Kieselgel H (Merck), (Laufmittel: Cyclohexan-Essigester, 5:4, v/v) und an Aluminiumoxyd neutral (Merck), (Laufmittel: wasserfreier Diäthyläther) verliefen jedoch negativ. Größere Erfolgsaussichten schien die Verwendung von Polyacrylnitril zu bieten: Sofern sich die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse auf die Säulenchromatographie übertragen ließen, sollte es möglich sein, die Gruppe DHK, THY, DHM und K an diesem Sorbens von den langsamer wandernden Verbindungen MK und M abzuscheiden.

Zur Klärung der Frage führten wir Modellversuche an Quarzsäulen durch, wobei das Füllmaterial mit einem Zusatz von Fluoreszenz-Leuchtpigment (SN-Super, Fa. Riedel de Haen) versehen wurde, um die angestrebte Zonenauftrennung bereits in der Säule wahrnehmen zu können. Leider gelang es uns jedoch weder mit dieser Technik noch bei der Nacharbeitung eines von Dahn u. Fuchs (1962) angegebenen Verfahrens zur horizontalen Säulenchromatographie in Dialyseschläuchen, befriedigende Trennergebnisse an Polyacrylnitril zu erzielen.

Auch die Ermittlung der Verteilungskoeffizienten für THY (synth.) und M (nat.) - in den beiden Substanzen wählten wir zwei Vertreter der Lactongruppe, deren Lösungseigenschaften sich relativ gut unterscheiden - führte in den folgenden, von uns geprüften Systemen nicht zu ausreichenden Trennfaktoren für einen erfolgreichen Einsatz der Craig-Verteilung:

Chloroform-Tetrachlorkohlenstoff / Methanol (Äthanol)-Wasser,
Methylenchlorid-Isooctan / Methanol (Äthanol)-Wasser,
1,2-Dichloräthan-Isooctan / Methanol (Äthanol)-Wasser,
Methylisobutylketon-Isooctan / Methanol (Äthanol)-Wasser.

Der Erprobung anderer Verteilungssysteme stand die geringe Löslichkeit der Kawalactone in hydrophilen Solventien entgegen, so daß wir gezwungen waren, erneut auf adsorptionschromatographische Verfahren zurückzugreifen.
Unter den Adsorptionsmitteln hatte Aktivkohle sich eindeutig als das bestgeeignete Agens zur Lösung unserer Aufgabe erwiesen.

Um kristallisationsfähige Lösungen von MK zu erhalten, mußten wir die infrage kommenden Fraktionen des ersten säulenchromatographischen Durchlaufs einerseits von den Verbindungen DHK, PHY, DHM und K befreien, die zwar an Aktivkohle etwas rascher wandern als das gesuchte MK, aber infolge ihrer Adsorptionscharakteristik (gekrümmte Isothermen) auch in den späteren Eluatfraktionen noch anzutreffen sind. Eine weitgehende Abtrennung dieser Gruppe von den Verbindungen MK und M gelang durch Rechromatographie unter den gleichen Bedingungen.

Eine weitere Schwierigkeit bestand darin, daß das mengenmäßige Überwiegen von M gegenüber dem etwas schwächer adsorbierten MK zu einer Zonenüberlappung in der Säule führen mußte und daher den Vorlauf des letzteren und die Gewinnung reiner MK-Fraktionen verhinderte.
Um den gesuchten Stoff in den Gemischen mit M anzureichern, ließen wir die fraglichen Lösungen in Äther mehrfach zur freiwilligen Kristallisation kommen und trennten so lange von dem schwerer löslichen Methysticin ab, bis die Mutterlauge beide Substanzen zu etwa gleichen Anteilen enthielt.
Bei einer anschließenden dritten Säulenchromatographie an Aktivkohle (Laufmittel Benzol) konnten wir dann Fraktionen auffangen, die als Hauptbestandteil MK neben Spuren von K und M aufwiesen. Durch Umkristallisation ihrer Verdampfungsrückstände aus Äthanol-Äther erhielten wir schließlich ca. 8 mg einer chromatographisch einheitlichen Substanz, die sich sowohl auf Kieselgel G- als auch auf Polyacrylnitril-Platten in Laufhöhe und

Farbreaktion mit Phosphorsäure-Anisaldehyd wie das synthetische p-Methoxykawain verhielt.

Die Verbindung kristallisiert in weißen, sehr feinen, miteinander verfilzten Nadeln, die ihr makroskopisch ein watteartiges Aussehen geben. Das Präparat zeigte zunächst ein Schmelzintervall zwischen 119 und 124°. Der geringen Ausbeute wegen konnten wir nur eine Mikromenge durch Absaugen der niedriger schmelzenden Eutektika auf gehärtetem Filtrierpapier vollständig von anhaftenden Verunreinigungen befreien (Methode nach Kofler u. Wannenmacher 1940). Der Schmelzpunkt des so gereinigten Produktes (123-124°) stimmt genau mit dem von synthetisch gewonnenem p-Methoxykawain (123°) überein.

In Analogie zu den Eigenschaften anderer natürlich vorkommender Kawalactone vom Typ des 5,6-Dihydro-α-pyrons war zu erwarten, daß das aus der Droge isolierte p-Methoxykawain die Ebene des polarisierten Lichtes dreht. Die optische Aktivität dieser Verbindungen ist bedingt durch die Asymmetrie des C-Atoms 6, das die Möglichkeit zur Ausbildung von zwei Spiegelbildisomeren bietet.
Wegen der geringen Menge an uns zur Verfügung stehender Substanz konnten wir leider keine polarimetrische Prüfung der gewonnenen Verbindung vornehmen. Für das Vorliegen eines optisch aktiven Naturstoffes spricht die Beobachtung, daß der Schmelzpunkt eines Gemisches aus synthetischem und natürlichem MK gegenüber den Einzelproben um ca. 8° erniedrigt wird (Mischschmelzpunkt = 114-115°). Im Gegensatz zu den Verbindungen DHK, DHM, K und M, bei denen auch die Schmelztemperaturen der optisch aktiven Komponenten und der (synthetischen) Racemate jeweils deutlich differieren, besteht jedoch zwischen den entsprechenden Werten für reines MK natürlicher und synthetischer Herkunft auffallenderweise kein Unterschied.

Zum Beweis der Identität der isolierten Verbindung mit synth. p-Methoxykawain dienten ferner:

a) Die Farbreaktion mit H_2SO_4 conc.:

Beide Substanzen nehmen beim Tüpfeln mit dem Reagens sofort eine leuchtend rote Farbe an, die nach kurzer Zeit in ein uncharakteristisches dunkel bis schwarz übergeht;

b) der Verlauf der UV-Spektren:

Das wegen Mangel an Untersuchungssubstanz in einer äthanolischen Lösung unbekannter Konzentration aufgenommene Absorptionsspektrum der isolierten Verbindung läßt sich bei graphischer Darstellung (log E gegen λ) vollständig zur Deckung bringen mit der spezifischen Extinktionskurve von p-Methoxykawain (λmax. = 264 nm, log ε = 4,39, und 290-294 nm, Inflexion; s. Abb. 9).

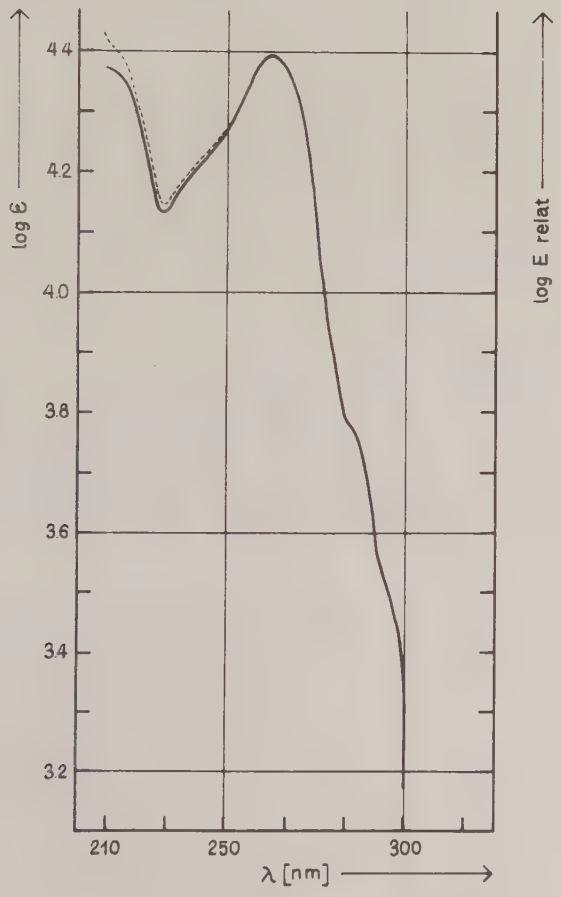


Abb. 9 UV-Spektren von synthetischem (——) und natürlichem (- - - -) p-Methoxykawain.

c) Versuche zur Isolierung und Identifizierung von THY.

Unsere Bemühungen, die Verbindung mit Hilfe der vorher genannten Verfahren in präparativem Maßstab aus der Droge zu gewinnen, blieben leider ohne Erfolg. Die Abtrennung von THY aus den Gemischen mit DHK, DHM und K bereitete aufgrund der großen Ähnlichkeit im analytischen Verhalten der vier Substanzen und infolge eines - sowohl absolut wie im Vergleich zu den Begleitkomponenten - extrem geringen mengenmäßigen Vorkommens der Verbindung Schwierigkeiten, die mit den uns zur Verfügung stehenden methodischen Mitteln nicht zu überwinden waren.

Ergänzend zu den bereits beschriebenen Isolierungsversuchen prüften wir daher in diesem Falle noch die Möglichkeit, durch präparative Dünnschichtchromatographie wenigstens eine Mikromenge der Substanz in reiner Form darzustellen, um ihre Identität mit synthetischem THY beweisen zu können. Die Erfolgschancen für dieses Vorgehen waren jedoch wiederum begrenzt durch:

a) die geringe Kapazität des erforderlichen Sorptionsmittels (Polyacrylnitril),

b) die für analytische Zwecke zwar ausreichende, für eine präparative Trennung aber unbefriedigende Unterscheidung der R_f-Werte von DHK, THY, DHM und K auf der DC-Platte; die Chromatogrammflecke grenzen nämlich ohne eine dazwischenliegende Leerzone direkt aneinander,

c) die Möglichkeit einer Instabilität der Verbindungen im kurzwelligen UV-Licht, die wir aufgrund folgender Beobachtung in Erwägung zogen: Die vier Lactone sind ohne Behandlung mit Sprühreagens auf der Platte nur im kurzwelligen UV-Bereich (ca. 260 nm) als dunkle Flecke erkennbar. Wir stellten aber fest, daß die Zonen nach der Strahleneinwirkung, selbst wenn diese nur sehr kurze Zeit anhält, auch beim Betrachten im längerwelligen UV (um 366 nm) deutlich hervortreten. Es mußte daher angenommen werden, daß die Einwirkung von kurzwelligem UV-Licht Veränderungen der Molekülstruktur zur Folge hat.

Zur präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die Platten wegen des hohen Siedepunktes von Malonester (199°) mit Cyclohexan-Essigester- oder Cyclohexan-Aceton-Gemischen entwickelt (85:15 bzw. 9:1, v/v), um das Laufmittel leichter quantitativ von der Sorptionsschicht entfernen zu können. Die infrage kommenden Chromatogrammzonen wurden möglichst rasch unter der UV-Lampe gekennzeichnet, von der Platte abgeschabt und das so gewonnene Material mit Äthanol p.a. extrahiert. Vom Filtrat der eingeengten äthanolischen Lösung nahmen wir ein UV-Spektrum auf.

Zur Kontrolle möglicher Veränderungen während der dünnschichtchromatographischen Behandlung wurde ferner synthetisches THY den gleichen Bedingungen ausgesetzt, d.h. wir haben die Verbindung nach der Rückgewinnung von DC-Platten erneut spektrophotometrisch geprüft. Wie Tab. 7 zeigt, stimmt die Lage der drei Absorptionsmaxima bei allen drei Untersuchungsproben gut überein. Die beiden dünnschichtchromatographisch zurückgewonnenen Präparate natürlicher wie synthetischer Herkunft weisen jedoch im Vergleich zu der nicht vorbehandelten synthetischen Substanz eine erhebliche Erniedrigung des ersten Kurvengipfels (226 nm) im Verhältnis zu den beiden langwelligeren Maxima bei 278 und 284 nm auf. Damit findet die erwähnte Veränderung im Fluoreszenzverhalten der Verbindungen auf der DC-Platte auch hier eine Entsprechung, so daß eine durch den Bestrahlungsvorgang induzierte partielle Molekülveränderung angenommen werden kann.

Aufgrund der gefundenen Übereinstimmung im analytischen Verhalten von synthetischem THY und einem neuen, dünnschichtchromatographisch nachgewiesenen Inhaltsstoff des Kawaextraktes halten wir das natürliche Vorkommen dieser Verbindung in der Kawadroge für gesichert. Die Substanz liegt jedoch in den von uns untersuchten getrockneten Rhizomteilen in so geringen Mengen vor, daß es mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht möglich war, sie in präparativem Maßstab aus dem Pflanzenmaterial zu isolieren.

Geprüfte Substanz	Lage der Maxima (nm)	Verhältnis der Amplitudenwerte	
		$E_1 : E_2$	$E_2 : E_3$
THY synth.	1) 226 ($\log \varepsilon = 5,29$) 2) 278 ($\log \varepsilon = 4,24$) 3) 284 ($\log \varepsilon = 4,17$)	11,2	1,18
THY nat.	1) 226 2) 275 3) 284	6,9	1,10
THY synth. nach Rückgew. v. DC-Platte	1) 226 2) 278 3) 284	6,2	1,07

Tab. 7 Vergleich der Abszissenwerte und Amplitudenverhältnisse für die 3 Extinktionsmaxima bei 1.) synth., 2.) dc-isoliertem nat. und 3.) dc-rückgewonnenem synth. Tetrahydroyangonin.

B) Säulenchromatographische Auftrennung des Kawaextraktes an Kieselgel.

1) Prüfung auf das natürliche Vorkommen von Dehydromethysticin.

Die vorausgegangenen adsorptionsanalytischen Untersuchungen hatten gezeigt, daß die Verbindung 5,6-Dehydromethysticin, deren Auftreten oder Fehlen in der Kawadroge wir im Rahmen dieser Arbeit klären wollten, bei der Säulenchromatographie an Aktivkohle unter den beschriebenen Bedingungen kaum oder nicht eluiert wird. Zur Prüfung auf das Vorkommen dieser Substanz mußte daher eine zweite Aufarbeitungsmethode herangezogen werden.

Dünnschichtchromatographische Vorprüfungen auf Kieselgel G-Platten (Laufmittel: Cyclohexan-Essigester 1:1 und 7:3, v/v) ließen erkennen, daß die Elutionsfolge an diesem Sorptionsmittel für einige Bestandteile des Extraktes invers verläuft zu der an Aktivkohle ermittelten Reihe; Tab. 8 zeigt eine Gegenüberstellung der diesbezüglichen Untersuchungsbefunde.

System I	System II
1) DHK	1) Flav. B
2) THY	2) Flav. A
3) DHM	3) DesY
4) K	4) DHK
5) MK	5) THY
6) M	6)
7) DesY	7) DHM = Y = DeHM
8) Y	8)
9) DeHM	9) K
10)	10)
11) Flav. A und B	11) MK = M

Tab. 8

Gegenüberstellung der Elutionsfolgen für Verbindungen vom Typ der Kawalactone in den Systemen Aktivkohle/Methylenchlorid (I) (Laut Befunden der sc. Analyse sowie Kenntnis der Adsorptionsisothermen) und Kieselgel G/Cyclohexan-Essigester (II) (laut dc-Befunden). (Anordnung nach fallender Wanderungsgeschwindigkeit)

Obgleich die sehr kleinen R_f-Differenzen keine befriedigende Auftrennung der einzelnen Lactone durch die Säulenchromatographie an Kieselgel erwarten ließen, konnte die Extraktanalyse nach dieser Methode doch zur Klärung unserer speziellen Frage beitragen.

Wir haben daher versuchsweise 6 g des vom Methylenchlorid befreiten, in Essigester aufgenommenen Gesamtextraktes aus der Handelsdroge - o h n e vorherige Abtrennung der Y- und M-

Anteile - an einer Kieselgel H-Säule (Merck) chromatographiert. Dazu wurden 300 g Adsorbens mit Cyclohexan-Essigester (6:4) in eine Säule von 4,5 cm Durchmesser eingeschlämmt und nach Aufgabe des Trenngutes mit dem gleichen Lösungsmittelgemisch eluiert; die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits in Tab. 5 dargestellt.

Sofern DeHM einen Bestandteil des aufgegebenen Trenngutes darstellte, sollte die Substanz nach der Säulenpassage hauptsächlich in den Eluatfraktionen III und IV enthalten sein. Sie ließ sich jedoch bei der dünnschichtchromatographischen Prüfung weder in diesen Fraktionen noch in anderen Eluatanteilen nachweisen; ferner gelang es uns nicht, die gesuchte Verbindung in einer Probe des ätherunlöslichen Extraktanteils analytisch zu erfassen. Die nach der beschriebenen Methode durchgeführten Untersuchungen geben somit keinen Anhaltspunkt dafür, daß Dehydromethysticin als ein Inhaltsstoff von Piper methysticum vorkommt.

2) <u>Nachweis und Isolierung eines weiteren Kawa-Inhaltsstoffes.</u>
Im Verlauf unserer dünnschichtchromatographischen Arbeiten an Kieselgelplatten war aufgefallen, daß sich bereits bei der Prüfung des Gesamtextraktes ein weiterer, im UV-Licht ohne vorausgehende Behandlung mit Sprühreagens gelb fluoreszierender Fleck zu erkennen gab, welcher keinem der bekannten Kawastoffe zugeordnet werden konnte.

Die Substanz wandert auf dem Chromatogramm (Kieselgel G Cyclohexan-Essigestergemische) langsamer als das gleichfalls durch seine gelbe Fluoreszenzfarbe hervortretende Yangonin, so daß der ihr zugehörige Fleck leicht als "Schwanzzone" der letztgenannten Verbindung fehlgedeutet und übersehen werden kann.
Verwendet man jedoch Kieselgelplatten mit einem Leuchtstoffzusatz, so werden beide Flecke deutlich durch eine schmale dunkle Zone - entsprechend dem durch Fluoreszenzlöschung sichtbar gemachten Methysticin - gegeneinander abgegrenzt und unterscheiden sich durch eine schwache Nuancierung des für Yangonin typischen gelbgrünen Farbtons zu einem reineren gelb bei der unbekannten Substanz.

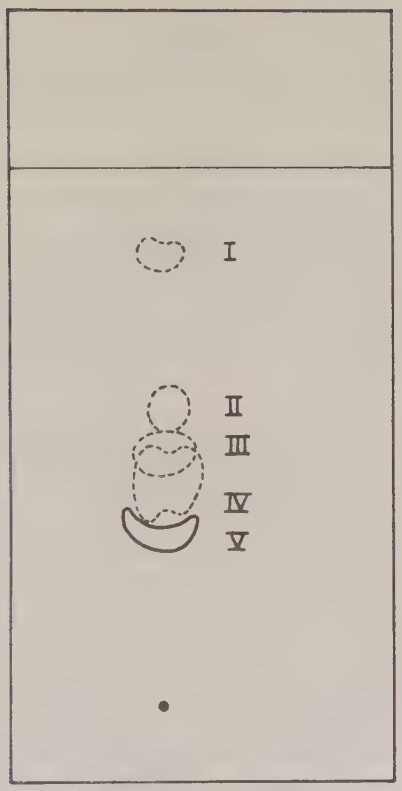


Abb. 10
Dünnschichtchromatogramm vom Methylenchlorid-extrakt aus Kawarhizom.

(System: Kieselgel G + Leuchtpigment / Cyclohexan:Essigester 1:1, v/v)

I = Flavokawin A und B
II = Desmethoxy-Yangonin
III = Yangonin
IV = übrige Kawalactone
V = 11-Methoxy-Yangonin

ur Gewinnung des (für die weitere Arbeit zunächst mit "xg" ezeichneten) neuen Stoffes wurden nochmals 20 g Methylen-hloridextrakt aus der Handelsdroge nach dem angegebenen erfahren an einer Kieselgel H-Säule aufgetrennt (Säulen-urchmesser = 5,5 cm, Kieselgel H (Merck) = 300 g). Nach urchlauf von ca. 1 650 ml Lösungsmittel enthielt das Eluat eben xg vorwiegend Methysticin sowie noch kleinere Restan-eile der übrigen Lactone. Zur Reinigung dieser Fraktionen echromatographierten wir nochmals über Kieselgel H unter erwendung von Methylenchlorid-Essigester (90:10, v/v) als aufmittel, um die lipophileren Begleitstoffe feiner abzu-rennen. Wir erhielten annähernd reine xg-Lösungen, aus deren

Destillationsrückstand die Verbindung aus wasserhaltigem Äthanol zur Kristallisation gebracht werden konnte. Sie fiel nach zweifachem Umkristallisieren in Form gelber, ziemlich grober Nadeln vom Fp. 162-164° als chromatographisch einheitliche Substanz an.
Ohne Aufarbeitung der Mutterlaugen und der weniger angereicherte Fraktionen gewannen wir 17,4 mg des zunächst unbekannten Stoffes aus 20 g Extrakt (entsprechend 300 g der lufttrockenen Droge). Der Gehalt des Kawarhizoms an xg berechnet sich danach auf etwa 6 mg%.

3) Identifizierung von xg.

Das chromatographische Verhalten sowie der Verlauf des UV-Spektrums von xg ließen vermuten, daß es sich bei der neuen Verbindung um einen dem Yangonin strukturanalogen, durch zusätzliche Substitution am aromatischen Ring hydrophilisierten Körper handelte. Die Verbindung löst sich in methanolischer KOH unter intensiver Farbvertiefung; beim Ansäuern dieser Lösung fällt eine Substanz von wesentlich hydrophilerem Charakter als das Ausgangsprodukt, die unter den angewandten DC-Bedingungen am Startfleck liegenbleibt.
Dieses Verhalten stützte unsere Annahme einer lactonischen (Ester-) Gruppierung, die im alkalischen Milieu hydrolysiert wird. Aufgrund des negativen Ausfalls der $FeCl_3$- sowie Phosphormolybdänsäure-Reaktionen konnten freie phenolische OH-Gruppen ausgeschlossen werden, dagegen deutete eine Rotfärbung mit Millon's Reagens auf eine Phenoläther-struktur der Verbindung.
Die Ergebnisse dieser orientierenden Vorversuche ließen auf einen Molekülbau schließen, der sich lediglich durch das Vorhandensein zusätzlicher Methoxylgruppen im aromatischen Teil von der Konstitution des Yangonins unterschied.

Über den Nachweis eines zweifach methoxylierten Yangonin-abkömmlings, des 4-Methoxy-6-(3,4-dimethoxystyryl)-α-pyrons (= 11-Methoxy-Yangonin) im Holz und in der Rinde von Aniba firmula Mez (Fam. Lauraceae) wurde von Mors u. Mitarb. (1962) berichtet. Aus früheren Arbeiten dieser brasilianischen

Arbeitsgruppe war ferner bekannt, daß weitere monocyclische α-Pyrone vom Typus der Kawalactone in südamerikanischen Aniba-Arten gefunden wurden, so das 5,6-Dehydrokawain (= DesY) gleichfalls in Aniba firmula Mez (Gottlieb u. Mors 1958 u. 1959) und das - nach unseren Untersuchungen im Kawaharz n i c h t vorhandene - 5,6-Dehydromethysticin in A. Heringerii (Mors, Taveira Magalhaes et al. 1962).

Edwards, Lewis u. Wilson (1961) erhielten 11-Methoxy-Yangonin bereits bei der Methylierung einer aus Polyporus hispidus (Bull.) Fr. isolierten Substanz und erkannten die Verbindung als den Trimethyläther des von ihnen gefundenen und identifizierten Naturstoffes 4-Hydroxy-6-(3,4-dihydroxystyryl)-α-pyron (= Hispidin). Im Rahmen der Konstitutionsaufklärung wurde das Tri-O-methylhispidin von den Autoren synthetisiert.

Unsere Substanz xg stimmte in den Schmelzpunkt- und UV-Extinktionswerten gut überein mit den entsprechenden Angaben in der erwähnten Literatur:

Substanz	Fp.	λ max. (log ε)
Compound A aus A. firm. (= 11-OCH_3-Y)	160-161°	250 nm (4.16) 365 nm (4.38)
Hispidin-trimethyläther (= 11-OCH_3-Y)	164°	251 nm (4.17) 366 nm (4.39)
"xg"	162-164°	250 nm (4.15) 365 nm (4.41)

Wir haben daraufhin die Verbindung 11-Methoxy-Yangonin nach der von Bu'Lock u. Smith (1960) angegebenen, von Edwards, Lewis u. Wilson (1961) modifizierten Methode synthetisiert durch Kondensation von Methyltriacetsäurelacton (4-Methoxy-6-methyl-α-pyron) mit Veratrumaldehyd in Gegenwart von Magnesium.

Die Identität des Syntheseproduktes mit der isolierten Verbindung xg konnte durch analytischen Vergleich gesichert werden, s. Tab. 9 (Hänsel u. Klaproth i. Dr.).

Analytisches Verhalten	Verbindung xg	11-Methoxy-Yangonin
Schmelzpunkt	162 - 164°	162 - 164°
Mischschmelzpunkt	162 - 164°	
Fp. der Eutektika		
a) mit Benzanilid	131°	130,5°
b) mit Dicyandiamid	154°	153,5°
DS-Chromatographie		
a) System I *	R_f = 0,45	R_f = 0,45
b) System II **	R_f = 0,3 (schwänzend)	R_f = 0,3 (schwänzend)
UV-Spektrum in Äthanol p.a. *** (log ε)	λ max. 220 nm (4.35) 250 nm (4.15) 365 nm (4.41) λ min. 210 nm (4.28) 238 nm (4.10) 285 nm (3.63)	λ max. 221 nm (4.34) 250 nm (4.15) 365 nm (4.41) λ min. 210 nm (4.28) 238 nm (4.09) 285 nm (3.62)
IR-Spektrum (KBr) s = starke Bande m = mittelstarke Bande w = schwache Bande	ν max. 2950 w 1250 s 2810 w 1182 m 1700 s 1150 s 1635 s 1025 s 1590 m 1005 m 1550 s 958 s 1520 s 920 w 1460 s 890 w 1410 s 840 m 1340 w 820 m 1305 m 755 m	ν max. 2950 w 1250 s 2810 w 1182 m 1700 s 1150 s 1635 s 1025 s 1590 m 1005 m 1550 s 958 s 1520 s 920 w 1460 s 890 w 1410 s 840 m 1340 w 820 m 1305 m 755 m
Verbrennungswerte $C_{16}H_{16}O_5$ (288,3)	Ber.: C = 66,66; H = 5,59 Gef.: C = 66,66; H = 5,30	Ber.: C = 66,66; H = 5,59 Gef.: C = 66,54; H = 5,44
Methoxylbestimmung	Ber. für 3 OCH_3 : 32,30 Gef.: 32,58	

Tab. 9

Vergleich der aus dem Kawarhizom isolierten Substanz xg mit synthetisiertem 4-Methoxy-6-(3,4-dimethoxystyryl)-2-pyron (= 11-Methoxy-Yangonin).

*) System I = Kieselgel G - Methylenchlorid:Essigester 7:3, (v/v);

**) System II = Polyacrylnitril - Cyclohexan:Essigester 8:2, (v/v);

***) die Messungen erfolgten sofort nach dem Lösen der Substanzen, beim Stehenlassen in äthanolischer Lösung verändern sich die Spektren.

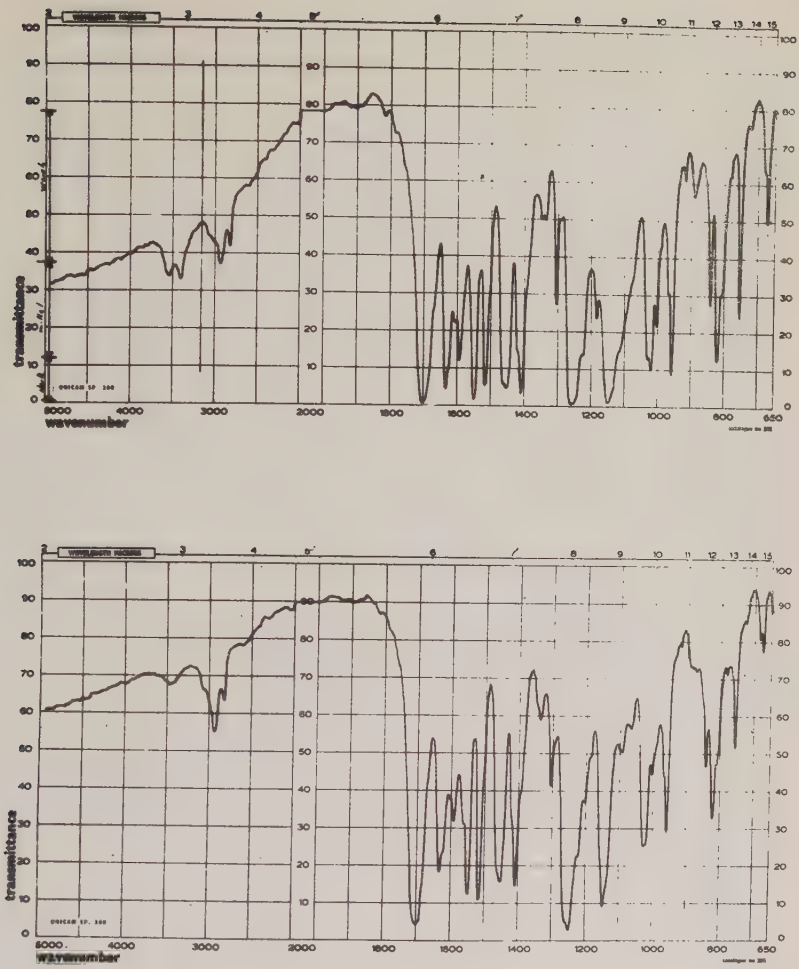


Abb. 11

IR-Spektren von synthetischem 11-Methoxy-Yangonin (obere Kurve) und der aus dem Kawarhizom isolierten Verbindung xg = natürliches 11-Methoxy-Yangonin (untere Kurve).

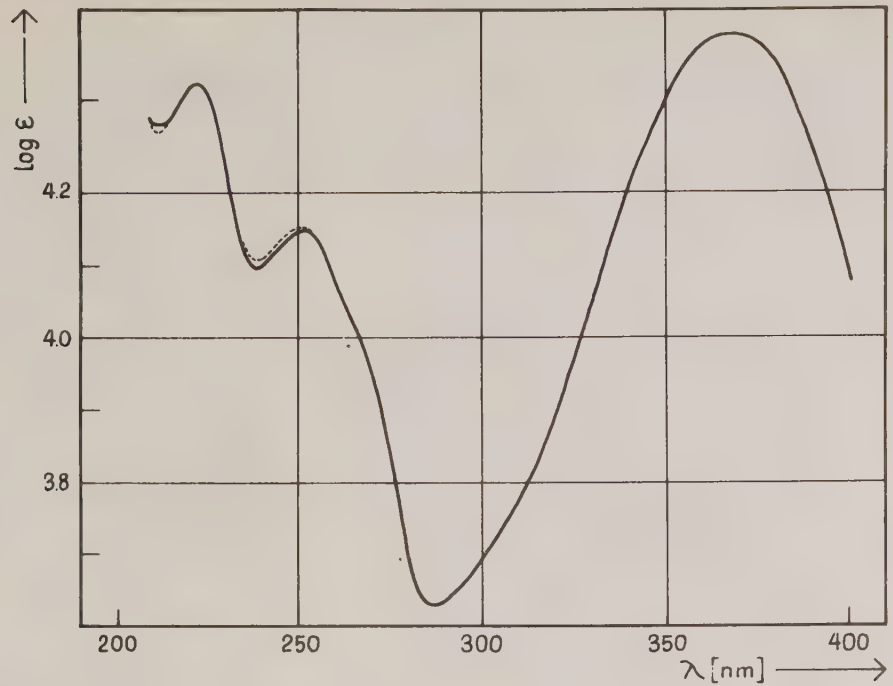


Abb. 12

UV-Spektren von synthetischem (——) und natürlichem (- - - -) 11-Methoxy-Yangonin.

AUSWERTUNG und DISKUSSION der ERGEBNISSE aus TEIL II.

Im Rhizom von Piper methysticum FORSTER werden neben den bisher bekannten sechs Kawalactonen drei weitere Strukturvarianten des 4-Methoxy-6-styryl-α-pyrons gefunden und identifiziert. Zwei der neuen Verbindungen stellen das Di- bzw. Tetrahydro-derivat des lange bekannten Kawa-Inhaltsstoffes Yangonin dar, während die dritte Substanz hinsichtlich ihres Sättigungsgrades den bereits beschriebenen Inhaltsstoffen Desmethoxy-Yangonin und Yangonin entspricht, sich jedoch durch das am aromatischen Ring auftretende Substitutionsmuster (3,4-dimethoxy-) von allen übrigen Vertretern dieser Stoffgruppe unterscheidet.

Vergleicht man die damit vervollständigte Reihe der in Piper methysticum nachgewiesenen Lactone mit den bei systematischer Kombination der drei verwirklichten Differenzierungsmerkmale "denkbaren" Möglichkeiten der Molekülausgestaltung, so ergibt sich das in Tab. 10 dargestellte Bild:

Variationsprinzip			Inhaltsstoff	als Inh.-stoff nicht nachweisbar
Substituenten R_1 (C-12)	Hydrierung d.Dppbdg.			
R_2 (C-11)	Δ 5	Δ 7		
$R_1 = R_2 = H$	–	–	DesY	
	+	–	K	
	+	+	DHK	
$R_1 = OCH_3$;	–	–	Y	
$R_2 = H$	+	–	MK *)	
	+	+	THY *)	
$R_1 + R_2 =$	–	–	---	DeHM
$-OCH_2O-$	+	–	M	
	+	+	DHM	
$R_1 = R_2 =$	–	–	11-MO-Y *)	
OCH_3	+	–	---	+
	+	+	---	+

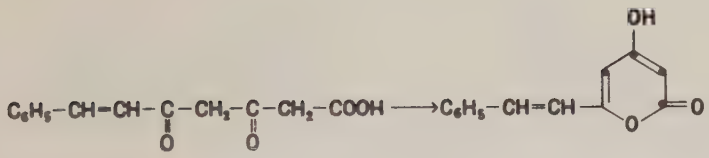
*) = im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesene Kawa-Inhaltsstoffe.

Tab. 10 Kombinationsschema der bei den Kawalactonen verwirklichten strukturellen Variationsprinzipien.

Für das Vorkommen der als Naturstoffe bisher nicht bekannten Derivate des Phenyläthyl-α-pyrons (= 5,6-De-7,8-dihydro-Kawalactone) in der Pflanze wurde trotz gezielter Untersuchung kein Anhaltspunkt gefunden. Ebensowenig ließ sich unter den von uns angewandten Bedingungen die Verbindung 5,6-Dehydromethysticin in der Kawadroge nachweisen (vgl. Teil I).

Ziel der Arbeit war es, durch die Erfassung von drei hypothetischen Inhaltsstoffen, für deren genuine Existenz uns aufgrund von biogenetischen Überlegungen eine hohe Wahrscheinlichkeit gegeben schien, einige auffallende Lücken in der Reihe "denkbarer" Strukturvarianten des 4-Methoxy-6-styryl-α-pyrons zu schließen. Die gefundenen Ergebnisse sind einzuordnen in die - bisher allerdings nicht experimentell untermauerten - Vorstellungen von der biogenetischen Entstehung dieser Substanzen.

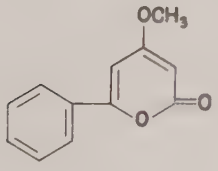
Mit der Isolierung der beiden Chalkone Flavokawin A und B aus dem Kawarhizom (Hänsel, Ranft u. Bähr 1963) erhielt die zuerst von Birch u. Donovan (1953) aufgestellte Theorie über einen biogenetischen Zusammenhang zwischen den Flavonoiden und den 6-Styryl-α-pyronen eine wesentliche experimentelle Stütze. Im Gegensatz zu der letztgenannten Stoffgruppe konnte der Biogeneseweg der C_6-C_3-C_6-Körper im pflanzlichen Organismus durch exakte analytische Befunde aufgeklärt werden. Die Flavonoide werden heute allgemein als Produkte einer Verknüpfung von drei Acetateinheiten mit einem getrennt vorgebildeten Phenyl-propanbaustein aufgefaßt (Birch 1957 und 1962; Grisebach 1962). - In der oben erwähnten Arbeit von Birch u. Donovan, in welcher die grundlegenden Gedanken der Acetathypothese erstmals dargelegt wurden, ist bereits die Vermutung ausgesprochen, daß auch die Kawalactone aus einem C_6-C_3-Körper hervorgehen, an den z w e i C_2-Bausteine angefügt werden, worauf aus der Enolform der intermediär auftretenden β-δ-Diketosäure eine Cyclisierung zum δ-Lacton erfolgt:



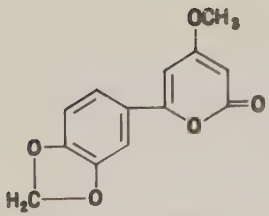
Betrachtet man die weitere Ausgestaltung dieses Grundkörpers zu den beschriebenen Naturstoffen, so kann zunächst zwischen durchgängig vorhandenen und substanz-spezifischen Merkmalen unterschieden werden.

1.) Als durchgängiges Strukturmerkmal der Stoffgruppe fällt das Vorkommen einer methylierten Sauerstoffunktion am Kohlenstoffatom C-4 auf; eine Gruppierung, die bei vier weiteren natürlich vorkommenden Derivaten des 6-Aryl-α-pyrons wiederzufinden ist, von denen jedoch nur e i n e Verbindung - das in Aniba firmula nachgewiesene 5,6-Dehydromethysticin (Mors und Mitarb. 1962) - auch hinsichtlich ihres Kohlenstoffskeletts ein direktes Analogon zu den Kawalactonen darstellt.

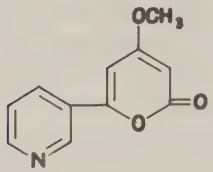
Bei den drei anderen aus südamerikanischen Aniba-Arten isolierten Verbindungen (I - III) ist der aromatische Teil direkt, ohne eine Kohlenstoffbrücke mit dem Pyronring verbunden, so daß für ihre Bildung ein C_6-C_1-Körper als Vorstufe angenommen werden muß.



(I) 4-Methoxyphenylcoumalin (Mors et al. 1960, aus Aniba fragrans).

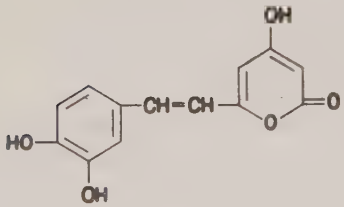


(II) 4-Methoxyparacotoin
(Mors et al. 1960, aus Aniba firmula).



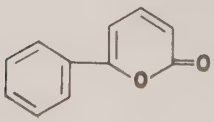
(III) Anibin
(Mors et al. 1960, aus Aniba fragrans).

Die aus Polyporus hispidus isolierte Substanz Hispidin (IV) trägt am C-4 eine unverätherte Hydroxylgruppe.

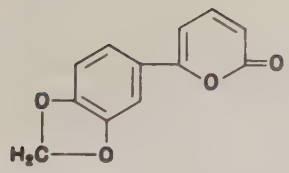


(IV) Hispidin
(Edwards, Lewis u. Wilson 1961; Edwards u. Wilson 1961, aus Polyporus hispidus).

Ein Fehlen der Sauerstoffunktion in 4-Stellung ist bisher nur bei zwei natürlich vorkommenden Vertretern des behandelten Strukturtyps gefunden worden; es sind die aus der "echten" Cotorinde (Nectandra Coto, Lauraceae ?) bzw. aus der Paracotorinde (Baticurea densiflora, Rubiaceae) gewonnenen Verbindungen Phenylcoumalin (V) und Paracotoin (VI).



(V) Phenylcoumalin
(Ciamician u. Silber 1894).



(VI) Paracotoin
(Jobst 1876;
Jobst u. Hesse 1879).

Der Entstehung des Pyronrings aus zwei Acetateinheiten zufolge stammt das Sauerstoffatom am Kohlenstoffatom 4 (entsprechend der Herkunft der beiden Hydroxylgruppen in 5- und 7-Stellung des A-Rings bei den Flavonoiden) aus den Thioestergruppen des Acetyl(Malonyl)-CoA. Das Fehlen dieser Funktion bei den beiden genannten Substanzen ist nach Mors et al. (1962 [b]) als ein nachträglicher Verlust zu deuten, wobei - wiederum für den Fall der Flavonoidbiosynthese - noch nicht geklärt ist, ob solche reduktive Entfernung von Sauerstoff nur an der offenen Poly-ß-ketosäure vollzogen wird, oder (bei Flavonoiden mit Resorcinstruktur im Ring A) auch nach dem Phloroglucin-Ringschluß noch möglich ist (Grisebach 1962).

Die biologische M e t h y l i e r u n g von enolisierten Sauerstoffunktionen findet dagegen - wahrscheinlich auf dem Wege einer CH_3^+ -Übertragung durch Cholin oder Methionin - sowohl am Phloroglucin- und Benzolkern als auch an der offenkettigen Ketosäure-Vorstufe leicht statt (Birch 1957).

2.) Die individuelle Konstitution der einzelnen Kawalactone ist einerseits durch die Anwesenheit von Substituenten am aromatischen Teil des C_6-C_3-Bausteins, zum anderen durch die jeweilige Oxydationsstufe des Kohlenstoffskeletts bestimmt. Es ist somit noch zu fragen, ob diese beiden Struktureigenschaften als Folge von Sekundärveränderungen am fertigen Lactongrundkörper aufzufassen sind, oder ob der Weg zur Endausgestaltung der verschiedenen Verbindungen sich bereits vorher verzweigt, indem unterschiedliche Bauelemente zur Synthese verwendet werden.

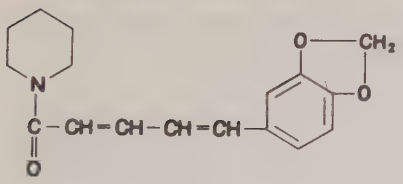
a) Zur Entstehung des Hydroxylierungsmusters bei den Phenylpropankörpern.

Die Frage nach dem Zeitpunkt der OH-Gruppen-Einführung in den aromatischen Rest der C_6-C_3-Vorstufe ist bisher ebenfalls nur für die Flavonoid-Biosynthese diskutiert und experimentell untersucht worden. In der Literatur wird die Alternative nicht eindeutig entschieden:
Während der Vorgang nach Swain u. Bate-Smith (1962) und Hess (1964) v o r der Ausbildung des C_6-C_3-C_6-Skeletts abläuft, folgert Grisebach (1962) aus dem experimentellen Befund, daß sowohl ^{14}C-markiertes Phenylalanin als auch markierte Zimtsäure in das Molekül von Quercetin und Cyanidin eingebaut werden (Grisebach 1957) die Möglichkeit einer n a c h t r ä g l i c h e n Substitution des zunächst freien B-Rings bei den Flavonoiden (s. auch Patschke u. Grisebach 1965). Andererseits schließt der Autor aber nicht aus, daß eine OH-Gruppe in 4'-Stellung auch bereits der Primärstruktur des C_6-C_3-Körpers angehören kann; der Sauerstoff stammt in diesen Fällen direkt aus dem O-Gehalt der Kohlenhydrate, welche nach heutiger Auffassung als Anfangsglieder in der Entwicklungskette zu den Phenylpropankörpern vom Typ Phenylalanin und Tyrosin anzusehen sind (Davis u. Mitarb. 1951-1958; Swain u. Bate-Smith 1962; Darstellung s.a. Dissertation G.Ranft 1963).

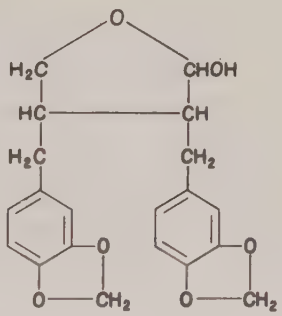
Über die Herkunft der p-ständigen Sauerstoffunktion in den Molekülen von Y und dessen Hydrierungsprodukten sowie von Flavokawin A läßt sich somit keine endgültige Aussage machen. Sicher verläuft die Einführung eines zweiten Sauerstoffatoms zur Ausbildung der Substitutionsmuster von 11-Methoxy-Yangonin und den Dioxymethylen-Derivaten (Methysticin, Dihydromethysticin) über eine enzymatische Hydroxylierung. Für die zeitliche Eingliederung dieses Vorgangs in den Biosyntheseablauf müssen jedoch ebenso wie für den Zeitpunkt der Methylierung die beiden aufgezeigten Möglichkeiten in Betracht gezogen werden.

In diesem Zusammenhang erscheint uns erwähnenswert, daß die Dioxymethylengruppierung auch bei zwei weiteren, für

die Gattung Piper charakteristischen Inhaltsstoffen angetroffen wird. Die beiden Verbindungen werden zwar unterschiedlichen chemischen Stoffklassen zugeordnet, ihre Molekülstruktur läßt jedoch, zumindest formal gesehen, stets den Einbau der entsprechend substituierten Phenylpropankörper erkennen: Die Piperinsäurekomponente im Molekül des Alkaloids P i p e r i n aus Piper nigrum (VII) kann als Reaktionsprodukt dieses Bausteins mit e i n e r Acetateinheit aufgefaßt werden und in der Struktur des Lignans C u b e b i n aus Piper cubeba L.fil. (VIII) sind zwei dioxymethylen-substituierte C_6-C_3-Körper direkt miteinander verknüpft. Durch ihre Lokalisation in pflanzlichen Sekretzellen sind die beiden Substanzen in gleicher Weise wie die Kawalactone als End- oder Ausscheidungsprodukte des Stoffwechsels charakterisiert.



(VII)



(VIII)

Piperin kommt nach Berger (1952) z.T. in kristalliner Form in den Harzzellen des Endospermgewebes von Piperfrüchten vor. Für die Lokalisation von Cubebin in den Früchten von Piper cubeba ließ sich in der Literatur keine Angabe finden; aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit beider Fruchtdrogen und im Hinblick auf den lipophilen Charakter des Lignans darf wohl vermutet werden, daß die Verbindung ebenfalls im ätherischen Öl angereichert wird. Die Lokalisation der Kawastoffe in differenzierten Ölzellen der Rhizom- und Wurzelrinde sowie des Markteils konnten wir selbst durch die Tüpfelprobe mit konz. Schwefelsäure am mikroskopischen Querschnittpräparat sichtbar machen: Die auftretende typische Rotfärbung ist deutlich auf die verstreut liegenden Ölbehälter begrenzt. Bei Cubebenfrüchten verhindert die dichte Verteilung von

Ölzellen diese Nachweismöglichkeit, da sich das gesamte Präparat sofort rot färbt.

Hänsel (1962), Schaaf (1964) und Rimpler (1964) haben am Beispiel der Verbreitung von verschiedenen Flavonoidglykosiden und -aglyka gezeigt, daß sich die Molekülausgestaltung bei solchen "sekundären Pflanzenstoffen" häufig in Verbindung bringen läßt mit bestimmten Prinzipien der Ausscheidung von Stoffwechselmetaboliten.

Da die Pflanze im allgemeinen nicht fähig ist, Endprodukte des Stoffwechsels nach außen zu exkretieren, kann sie die anfallenden Substanzen nur durch Speicherung in einer physiologisch inaktiven Form aus dem biochemischen Reaktionsgleichgewicht entfernen. Sofern ein morphologisch-anatomisch differenziertes Organsystem für die Aufnahme solcher Metabolite zur Verfügung steht (Ölzellen, Ölräume, Harzgänge oder Öldrüsen), so werden bevorzugt lipophilisierte Körper in die Exkretbehälter ausgeschieden (z.B. hochmethylierte Flavonaglyka). Fehlen dagegen spezielle Speicherorgane, so werden die Substanzen - am wirksamsten durch Glykosidierung - in eine wasserlösliche Form überführt und in der Vakuolenflüssigkeit angereichert.

Bei Annahme dieser Hypothese darf der Versuch gemacht werden, eine "physiologische Zweckmäßigkeit" in der chemischen Endausgestaltung von sekundären Pflanzenstoffen zu erkennen. Für unsere Fragestellung wäre eine nachträgliche Methylierung von freien Hydroxylen am aromatischen Kern der Verbindungen unter diesem Gesichtspunkt in gleicher Weise als "physiologisch sinnvoll" zu verstehen wie die Zusammenfassung von zwei benachbarten O-Funktionen zur Dioxymethylengruppe, da beide Veränderungen den lipophilen Charakter der Substanzen verstärken. Nicht verständlich wäre dagegen die zusätzliche Einführung von Sauerstoff in den Phenylpropananteil von Verbindungen, die anschließend als lipophile Endprodukte aus dem Stoffwechselgeschehen eliminiert werden. Nach diesen Überlegungen wäre der Auffassung, daß das Hydroxylierungsmuster der Phenylpropankörper bereits v o r derem weiteren Einbau in höhermolekulare Verbindungen festliegt, theoretisch die größere Wahrscheinlichkeit einzuräumen.

b) Zur Entstehung der Hydrierungstypen bei den Kawalactonen.

Durch Veränderungen im Sättigungsgrad des Kohlenstoffgerüstes variiert die Pflanze auch innerhalb des gleichen Substitutionstyps die strukturelle Ausgestaltung und bildet so insgesamt drei verschiedene Hydrierungstypen von Kawalactonen. Es soll auch für diesen Fall kurz diskutiert werden, ob und wie sich die Entstehungsweise der unterschiedlichen Sättigungsvarianten mit den oben dargelegten Biosynthesevorstellungen in Einklang bringen läßt, und ob im Sinne dieser Vorstellungen einem der drei Typen eine biogenetische Priorität zuerkannt werden kann.

Ausgehend von der Acetathypothese läßt sich die Herkunft der im Molekül aller natürlichen Lactonkörper auftretenden Zweifachbindung zwischen den C-Atomen 3 und 4 zwanglos auf eine Enolisierung der ß-ständigen ketonischen O-Funktion zurückführen, wobei die Enolform infolge der Methyläthergruppierung am Hydroxyl festgelegt ist.

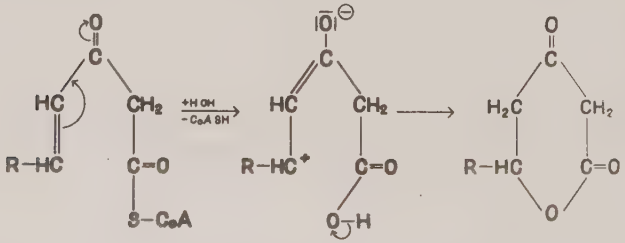
Die drei vorkommenden Hydrierungsvarianten sind charakterisiert durch die fakultative Anwesenheit von zwei weiteren Doppelbindungen in den Stellungen $\Delta 5$ + $\Delta 7$ (Y-Typ) oder $\Delta 7$ (K-Typ) und schließlich durch den Verlust von beiden bei den Tetrahydroderivaten (s. S. 11).

Dabei läßt sich das wahlweise Vorhandensein einer Äthylenstruktur zwischen den beiden Ringsystemen einerseits mit der Annahme erklären, daß primär unterschiedliche Oxydationsstufen von C_6-C_3-Körpern, d.h. neben Bausteinen vom Typ der Zimtsäure auch deren Sättigungsderivate, also ß-Phenylpropionsäuren, zur Biosynthese der Kawalactone verwendet werden. Andererseits ist auch denkbar, daß die endgültige Ausgestaltung der C-7,8-Bindung erst nach der Ausbildung des fertigen Lactonskeletts durch fermentative Hydrierung oder Dehydrierung vollzogen wird.

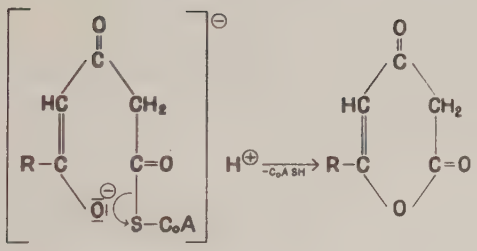
Im Gegensatz hierzu ist die theoretische Wahrscheinlichkeit für eine nachträgliche Veränderung der Pyronstruktur unter

Ausbildung von 5,6-Dihydropyronkörpern - ebenso wie die Wahrscheinlichkeit für den umgekehrten Reaktionsablauf - nur außerordentlich gering. Die Verwirklichung der beiden Verbindungstypen in der Pflanze erscheint uns daher eher verständlich, wenn man die Möglichkeit eines verzweigten Biogeneseweges in Betracht zieht und von folgenden spekulativen Überlegungen ausgeht:

1. In Analogie zur biologischen Fettsäuresynthese wäre denkbar, daß bereits in das Reaktionsprodukt eines C_6-C_3-Bausteins mit e i n e r C_2-Einheit durch ß-Reduktion und anschliessende Wasserabspaltung eine neue olefinische Doppelbindung eingeführt werden kann. Die durch darauffolgende Verknüpfung mit einem zweiten Molekül "aktivierter Essigsäure" entstehende ungesättigte Ketosäure würde nach dem abgebildeten Reaktionsmechanismus stets unter Ausbildung eines Dihydropyronderivates zyklisieren:



2. Daneben könnte für die Genese von Pyronkörpern ein zweiter Weg angenommen werden, nach welchem der Ringschluß durch Lactonisierung des Enolatanions aus einer n i c h t reduzierten Diketosäurevorstufe (entsprechend dem Mechanismus der Esterbildung) erfolgt:



Es soll an dieser Stelle betont werden, daß die dargelegten Vorstellungen auf dem Gedankengut und Wissen über chemische Reaktionsabläufe in der unbelebten Natur basieren. Welche Syntheseschritte die Pflanze tatsächlich zur Ausbildung unterschiedlich gesättigter Lactonkörper ausführt, kann mit Hilfe unserer Untersuchungsmethoden selbstverständlich nicht erfaßt werden.

Befunde über die mengenmäßige Verteilung, in der die einzelnen Strukturvarianten in der Pflanze auftreten, berechtigen jedoch ergänzend zu der Vermutung, daß die Verbindungen vom Typ des Styryldihydropyrons unmittelbare Vorstufen der Tetrahydrolactone darstellen, so daß die Absättigung der aliphatischen Doppelbindung $\Delta 7$ als Endprozeß der Molekülausgestaltung aufzufassen wäre.
Für diese Auslegung spricht nicht allein die Beobachtung, daß die Anteile an gesättigten Lactonen und ihren korrespondierenden $\Delta 7$-Dehydroderivaten einander bei den Vertretern aller drei Substitutionstypen größenordnungsmäßig proportional sind (DHK:K = THY:MK = DHM:M 1 : 2), sondern es läßt sich auch

eine weitere, in der Stoffverteilung gefundene Regelmäßigkeit konsequent in die Deutung einfügen:

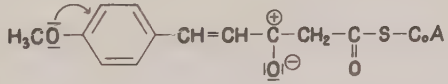
Vergleicht man nämlich das mengenmäßige Vorkommen von ungesättigten und 5,6-Dihydrovarianten jeweils unter den Verbindungen des gleichen Substitutionstyps, so ist eine auffallende Korrelation der beiden Variationsprinzipien Substitutionsmuster und Hydrierungsgrad festzustellen, wie aus der folgenden Gegenüberstellung hervorgeht:

Subst.muster:	Verh.d.Abs.mengen Styrylpyr./Styryl-DH-pyr.:	Verbindungen:
1) $R_1 + R_2 = OCH_2O$	0 : 1	(DeHM):M
2) $R_1 = R_2 = H$	ca. 1 : 0,5	DesY :K
3) $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$	ca. 1 : 10^{-3}	Y :MK
4) $R_1 = R_2 = OCH_3$	1 : 0	11-MOY:unbek.
5) $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$ *)	1 : 0	

Mit Ausnahme der (sich paradox verhaltenden) dioxymethylensubstituierten Körper ist das Gleichgewicht zwischen partiell hydrierten und ungesättigten Formen offenbar in dem Maße zugunsten der nicht-hydrierten Verbindungen verschoben, wie ihr aromatischer Kern mit elektronenliefernden Gruppen besetzt ist. Da die Beziehung für Verbindungen der o.g. Typen 4 und 5 auch bei den Inhaltsstoffen einer zweiten Piper-Art gleichsinnig wiederkehrt (Arbeiten von Sauer u. Hänsel, s. Anmerkung), möchten wir versuchen, einen - im Sinne unserer Entstehungshypothese denkbaren - Kausalzusammenhang zwischen dem Vorkommen sauerstoffhaltiger Substituenten und der bevorzugten Ausbildung

*) Die Verbindung 4-Methoxy-6-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-α-pyron wurde neben weiteren Inhaltsstoffen vom Typ der Kawalactone vor kurzem aus den unterirdischen Teilen einer botanisch nicht genau bestimmten Pfeffer-Art aus Neu Guinea (herbarisiert unter N.G.F. 19746 in Lae) isoliert (Hänsel, Sauer u. Rimpler 1966; Sauer u. Hänsel z.Zt. in Vorb.). Aufgrund von dc-Vergleichen haben wir inzwischen Anhaltspunkte dafür, daß die Substanz auch im Kawarhizom enthalten ist, wenngleich sie in wesentlich geringeren Mengen vorzukommen scheint. Sie wurde bisher nicht aus dieser Droge isoliert.

einer Pyronstruktur zu diskutieren. Die beobachtete Abhängigkeit erscheint uns reaktionschemisch verständlich, wenn man annimmt, daß sowohl die Doppelbindung in der Seitenkette als auch das jeweilige Substitutionsmuster bereits der Primärstruktur des eingebauten Phenylpropankörpers angehören, denn für diesen Fall kann von der Anwesenheit aromatischer Sauerstoffunktionen folgerichtig eine Benachteiligung des geforderten Reduktionsprozesses an der intermediär gebildeten C-11-Ketosäure erwartet werden. Dabei gehen wir davon aus, daß der entscheidende Reaktionsschritt in der Übertragung eines Hydridanions auf das positivierte C-Atom der Carbonylgruppe besteht. Da die Ladungsdichte an diesem Kohlenstoff im Falle der Konjugation durch Elektronenpaar-Donatoren am Phenylring abgeschwächt wird, würde der nukleophile Angriff erschwert, und das Molekül stabilisiert sich bevorzugt durch Enolisierung:



Ein Beispiel für solche reaktionshemmenden Einflüsse von elektronenliefernden Substituenten auf Carbanion-Additionen findet man in der organischen Chemie in der Umsetzungsbereitschaft zwischen aromatischen Aldehyden und aliphatischen Aldehyden oder Ketonen (Claisen-Schmidt-Kondensation): Während sich z.B. Benzaldehyd in Gegenwart von Alkali leicht mit Acetaldehyd zu Zimtaldehyd umsetzen läßt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit für die analoge Kondensation mit p-Methoxybenzaldehyd erheblich niedriger.

Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Übertragbarkeit von allgemeinchemischen Reaktionsmechanismen auf biochemische Vorgänge grundsätzliche Vorbehalte verlangt, und daß gedank-

lichen Analogieschlüssen keinerlei Beweiskraft für die tatsächlichen Verhältnisse zukommt. Sofern sich jedoch eine Reihe von experimentellen Befunden überhaupt unter einem gemeinsamen, übergeordneten Gesichtspunkt einordnen oder logisch-sinnvoll verstehen läßt, darf der gefundene Zusammenhang immerhin im Sinne einer hypothetischen Wahrscheinlichkeit diskutiert werden.

ZUSAMMENFASSUNG

1) Die spezifischen Einsatzmöglichkeiten für Aktivkohle als Adsorbens zur säulenchromatographischen Auftrennung lipophiler Stoffgemische bei Verwendung organischer Lösungsmittel werden beschrieben.
Am Beispiel einer Gruppe C_6-substituierter 4-Methoxy-α-pyrone vom Typus der Kawalactone wird die Abhängigkeit zwischen der Konstitution aromatischer Verbindungen und ihrer Adsorptivität an Aktivkohle in Modellstudien untersucht. Für 11 Substanzen des genannten Bautyps werden Adsorptionsisothermen aufgenommen und auf Erfüllung der Isothermengleichungen nach FREUNDLICH und LANGMUIR geprüft. Die eluotrope Reihe organischer Lösungsmittel an Kohle wird bestimmt.

2) Bei der elutionschromatographischen Auftrennung des Methylenchloridextraktes aus dem Rhizom von Piper methysticum an Aktivkohle werden zwei bisher unbekannte Strukturvarianten der Kawalactone gefunden. Die Substanz p-Methoxykawain wird isoliert und durch Vergleich mit synthetisiertem 4-Methoxy-6-(4-methoxystyryl)-5,6-dihydro-α-pyron identifiziert; die Verbindung Tetrahydroyangonin (= 4-Methoxy-6-(4-methoxyphenyläthyl)-5,6-dihydro-α-pyron) wird aufgrund ihres dc- sowie UV-Absorptions-Verhaltens mit dem synthetischen Produkt identifiziert.

3) Die als mögliche Inhaltsstoffe der Kawadroge vermuteten Derivate des 4-Methoxy-6-phenyläthyl-α-pyrons mit einem den bekannten Kawalactonen entsprechenden Substitutionsmuster können - ebenso wie die aus biogenetischen Gründen erwartete Verbindung 4-Methoxy-6-(3,4-methylendioxystyryl)-α-pyron (= 5,6-Dehydromethysticin) - nicht nachgewiesen werden.

4) Bei der säulenchromatographischen Analyse des Kawaextraktes an Kieselgel H (Merck) wird ein weiterer neuer Inhaltsstoff

in Piper methysticum gefunden und isoliert. Die Konstitution der Verbindung wird durch Vergleich mit synthetisiertem 4-Methoxy-6-(3,4-dimethoxystyryl)-α-pyron (= 11-Methoxy-Yangonin) aufgeklärt.

5) Ein von Hänsel u. Rimpler (1965) beschriebenes Verfahren zur dünnschichtchromatographischen Trennung der Kawalactone und ihrer synthetisch zugänglichen Strukturvarianten (C_6-substituierten 4-Methoxy-α-pyronen) an Polyacrylnitril (Bayer) kann durch Veränderung des Laufmittels verbessert werden.

L I T E R A T U R .

BÄHR, P., 1962: Dissertation FU Berlin

BEIERSDORFF, H.U., 1959: Dissertation FU Berlin

BERGER, F., 1952: Handbuch der Drogenkunde. Bd III, p. 359, Wien, Düsseldorf: Wilhelm Maudrich

BIRCH, A.J., 1957: in L. Zechmeister

---------- , 1962: in T.A. Geissmann

---------- , u. F.W. DONOVAN, 1953: Austral. J. Chem. 6, 360

BORSCHE, W., u. M. GERHARDT, 1914: Ber.dtsch.chem.Ges. 47, 2902

---------- , Ch. MEYER u. W. PEITZSCH, 1927: Ber.dtsch.chem.Ges. 60, 2113

---------- , u. W. PEITZSCH, 1929 a: Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 364

---------- , u. ----------, 1929 b: Ber.dtsch.chem.Ges. 62, 368

---------- , u. ----------, 1930: Ber.dtsch.chem.Ges. 63, 2414

---------- , u. A. ROTH, 1921: Ber.dtsch.chem.Ges. 54, 2229

---------- , u. C. WALTER, 1927: Ber.dtsch.chem.Ges. 60, 2112

BU'LOCK. J.D., u. H.G. SMITH, 1960: J. Chem. Soc. 502

CASON, J., u. G.A. GILLIES, 1955: J. Org. Chem. 20, 419

CASSIDY, H.G., 1940: J. Am. Chem. Soc. 62, 3073 u. 3076

---------- , u. S.E. WOOD, 1941: J. Am. Chem. Soc. 63, 2628

CHMIELEWSKA, J., u. J. CIESLAK, 1954: Roczniki Chem. 28, 38

CIAMICIAN, G., u. P. SILBER, 1894: Ber.dtsch.chem.Ges. 27, 841

CUZENT, G., 1860: Compt. rend. (Paris) 50, 436

---------- , 1861: Compt. rend. (Paris) 52, 205

DAHN, H., u. H. FUCHS, 1962: Helvet. Chim. Act. 45, 261

DAVIS, B.D., 1951: J. Biol. Chem. 191, 513

---------- , 1955: Adv. Enzym. 16, 247

---------- , 1958: Arch. Biochem. Biophys. 78, 497

EDWARDS, R.L., D.G. LEWIS u. D.V. WILSON, 1961: J.Chem.Soc. 4995

---------- , u. D.V. WILSON, 1961: J. Chem. Soc. 5003

FLORKIN, M., u. H.S. MASON: Comparative Biochemistry. New York, London: Acad. Press 1962, Bd III, p. 755

GEISSMAN, T.A.: The Chemistry of Flavonoid Compounds. Oxford, London, New York, Paris: Pergamon Press 1962, p. 618

GOBLEY, N.T., 1860: J. Pharm. Chim. 37, 19

GOTTLIEB, O.R., u. W.B. MORS, 1958: Anais Assoc. Brasil. Quim. 30, 527

GOTTLIEB, O.R., u. W.B. MORS, 1959 a: J. Org. Chem. 24, 17

---------- , u. ---------, 1959 b: J. Org. Chem. 24, 1614

GRIESSBACH, R., 1957: Austauschadsorption in Theorie und Praxis. Berlin: Akademie-Verlag

GRISEBACH, H., 1962: Planta medica 10, 385

---------- , 1957: Z. Naturforsch. 12 b, 227

HÄNSEL, R., 1962: Planta medica 10, 361

--------- , 1964: Dt. Apoth. Ztg 104, 459

--------- , u. H.U. BEIERSDORFF, 1959: Arzneim.-Forsch. 9, 581

--------- , u. L. KLAPROTH, 1966: Arch. Pharm. 299, 71

--------- , u. ----------, 1966: Arch. Pharm. i.Dr.

--------- , G. RANFT u. P. BÄHR, 1963: Z. Naturforsch. 18 b, 370

--------- , u. H. RIMPLER, 1965: Z. analyt. Chem. 207, 270

--------- , H. SAUER u. H. RIMPLER, 1966: Arch. Pharm. i.Dr.

HEŘMÁNEK, S., V. SCHWARZ u. Z. ČEKAN, 1963: Collect. Czechoslov. Chem. Commun. 28, 2031

HESS, D., 1964: Planta 60, 568

HESSE, G., u. M. ALEXANDER: zit. in E. Stahl, 1962, p. 496

JACQUES, J., u. J.P. MATHIEU, 1946: Bull. Soc. Chim. France 94

JOBST, J., 1876: Ber. dtsch. chem. Ges. 9, 1633

--------- , u. O. HESSE, 1879: Ann. Chem. 199, 17

KALAN, E.B., B.D. DAVIS, P.R. SPRINIVASAN u. D.B. SPRINSON, 1956: J. Biol. Chem. 223, 907

KLOHS, M.W., F. KELLER, R.E. WILLIAMS et al., 1959: J. Med. Pharm. Chem. 1, 95

KOFLER, L., u. WANNENMACHER, 1940: zit. in L. u. A. Kofler: Thermo-Mikro-Methoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgemische. Innsbruck: Univers.-Verlag 1954, 3. Auflage, p. 69

KOSTERMANS, D., 1950: Nature 166, 788

LEDERER, E., u. M. LEDERER, 1957: Chromatography. Amsterdam, London, New York: Elsevier

MORS, W.B., M.T. MAGALHAES u. O.R. GOTTLIEB, 1960: Anais Assoc. Brasil. Quim. 19, 193

--------- , ----------, O.A. LIMA, A.M. BITTENCOURT u. O.R. GOTTLIEB, 1962 a: Anais Assoc. Brasil. Quim. 21, 7

--------- , ----------, u. O.R. GOTTLIEB, 1962 b: in L. Zechmeister

NEHER, R., 1958: Chromatographie von Sterinen, Steroiden und verwandten Verbindungen. Amsterdam, London, New York: Elsevier, p. 12

NÖLTING, D.E., u. H. KOPP, 1874: Le Monit. Sci. 920

O'RORKE, M., 1860: Compt. rend. (Paris) 50, 598

PATSCHKE, L., u. H. GRISEBACH, 1965: Z. Naturforsch. 20 b, 103

POMERANZ, C., 1889: Monatsh. Chem. 10, 783

RANFT, G., 1963: Dissertation FU Berlin

REICHSTEIN, T., u. C.W. SHOPPEE, 1949: Discuss. Faraday Soc. 7, 305

RIMPLER, H., 1964: Dissertation FU Berlin

SALAMON, J.J., u. B.D. DAVIS, 1953: J. Am. Chem. Soc. 75, 5567

SAUER, H., u. R. HÄNSEL: z.Zt. in Vorbereitung

SCHAAF, K.D., 1964: Dissertation FU Berlin

SPRINIVASAN, P.R., M. KATAGIRI u. D.B. SPRINSON, 1955: J. Chem. Soc. 77, 4943

---------- , H.T. SHIGEURA, M. SPRECHER, D.B. SPRINSON u. B.D. DAVIS, 1956: J. Biol. Chem. 220, 477

---------- , D.B. SPRINSON, E.B. KALAN u. B.D. DAVIS, 1956: J. Biol. Chem. 223, 913

STAHL, E., 1962: Dünnschichtchromatographie. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer

SWAIN, T., u. E.C. BATE-SMITH, 1962: in Florkin u. Mason

TISELIUS, A., 1947: Adv. Prot. Chem. 3, 67

---------- , B. DRAKE u. L. HAGDAHL, 1947: Experientia 3, 21

TRAPPE, W., 1940: Biochem. Z. 305, 150

VAN VEEN, A.G., 1938: Proc. Akad. Wetenschappen, Amsterdam, 41, 855

---------- , 1939: Receueil Trav. chim. Pays-Bas. 58, 521

WEISS, U., B.D. DAVIS u. E.S. MINGIOLI, 1953: J. Am. Chem. Soc. 75, 5572

WERNY, F., u. R. HÄNSEL, 1963: Nat. wiss. 50, 355

WINZHEIMER, E., 1908: Arch. Pharm. 246, 338

ZECHMEISTER, L., 1957: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Bd 14, p. 186, Wien: Springer

---------- , 1962: Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Bd 20, p. 131, Wien: Springer

L E B E N S L A U F .

Ich wurde am 28. August 1929 als einziges Kind des Kaufmanns Karl Kaus und seiner Ehefrau Emmi, geb. Frank, in Frankfurt/Main geboren. Meine Schulausbildung begann 1936 in Hamburg, wo ich im Anschluß an eine vierjährige Grundschulzeit die Oberschule für Mädchen am Lerchenfeld besuchte und - nach mehrfachen kriegsbedingten Unterbrechungen durch Schulausfall und -wechsel - 1949 das Abitur ablegte.

In der ursprünglichen Absicht, einen sozialpädagogischen Beruf zu ergreifen, studierte ich danach zunächst 4 Semester Theologie und Jura an der Kirchlichen Hochschule und Universität Hamburg und war während dieser Zeit 4 Monate in einem Heim für schwererziehbare Kinder der Hamburger Jugendbehörde praktisch tätig.

Von 1951 bis 1953 absolvierte ich die für eine pharmazeutische Ausbildung vorgeschriebene Praktikantenzeit in der Glückauf-Apotheke in Barsinghausen (Deister) und bestand abschließend die pharmazeutische Vorprüfung in Hannover. Vom SS 1953 an studierte ich an der Math.-Nat. Fakultät der Universität Hamburg Pharmazie, machte im Mai 1956 das Staatsexamen und erhielt 1957 die Approbation als Apothekerin. In den beiden folgenden Jahren arbeitete ich in Roth's alter englischer Apotheke sowie in der Engel-Apotheke, Hamburg.

1959 trat ich als Mitarbeiterin in die Farbwerke Hoechst AG. ein und bin seitdem mit der Wahrnehmung des wissenschaftlichen Innendienstes im Arzneimittel-Kontor Berlin betraut. Neben der beruflichen Tätigkeit befaßte ich mich seit November 1962 mit der Anfertigung der vorliegenden Arbeit und war in diesem Zusammenhang ab WS 1962/63 an der Freien Universität Berlin immatrikuliert.

Meine 1958 in Hamburg geschlossene Ehe mit dem Apotheker Wolfgang Klaproth wurde im März 1960 rechtskräftig geschieden.